

„Evaluierung von Ergebnissen der Array-CGH-Untersuchungen bei Kindern mit
psychomotorischer Retardierung und assoziierter Symptomatik aus Sichtweise
der klinisch-genetischen Praxis“

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Marika Frank

geboren am 02. April 1991 in Gera

Gutachter:

Herr Prof. Dr. med. Christian Hübner

- Institut für Humangenetik Universitätsklinik Jena

Herr Prof. Dr. med. Ulrich Brandl

- Neuropädiatrie und SPZ Universitätsklinik Jena

Frau Prof. Dr. med. Ute Felbor

- Instituts für Humangenetik Universitätsklinik Greifswald

Datum der Verteidigung:

07.03.2017

Abkürzungen

a	Häufigkeit bei spezifischem Phänotyp
Abb.	Abbildung
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	complementary/komplementäre DNA aus RNA
CGH	comparative genomic hybridisation/ vergleichende genomische Hybridisierung
CFD	craniofaziale Dysmorphien
CMA	chromosomal microarray analysis
CNV	copy number variation/ Kopienzahlvariation
del	Deletion
dup	Duplikation
EBM	Einheitlicher Bewertungsmaßstab
et al.	und andere
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
IQ	Intelligenzquotient
Kb	Kilobase
KISS	Kopfgelenk-induzierte Symmetriestörung
Mb	Megabase
MLPA	Multiplex Ligation-depent Probe Amplification
MRT	Magnetresonanztomographie
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
SNP	single nucleotide polymorphism
VSD	Ventrikelseptumdefekt

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	3
2.1	Array-CGH	3
2.2	Fragestellungen und Indikationen zum Einsatz der Array-CGH	6
2.2.1	Indikationskriterien chromosomaler Aberrationen im Rahmen postnataler Diagnostik	6
2.2.2	Klärung der Ätiologie neurokognitiver Entwicklungsstörungen	6
2.2.3	Vor- und Nachteile Array CGH	9
2.3	Kopienzahlvariationen (Copy Number Variationen/CNV)	11
2.4	Zusammenhänge zwischen CNVs und Phänotyp	13
2.5	Effekte und Relevanz der CNV-Ausdehnung und -Anzahl	14
2.6	Mikrodeletionssyndrome/Mikroduplikationssyndrome	15
3	Zielsetzung	17
4	Material und Methodik	18
4.1	Art der Arbeit	18
4.2	Studienkollektiv	18
4.3	Einzelkasuistiken	19
3.4.1	Kasuistik 1	20
3.4.2	Kasuistik 2	22
3.4.3	Kasuistik 3	24
4.4	Durchführung der Array-CGH	25
4.5	Auswahl geeigneter Fachliteratur	26
4.6	Durchführung der Interpretation der gewonnenen Ergebnisse	26

5	Ergebnisse	27
6	Diskussion	39
6.1	Evaluierung der Array-CGH	39
6.2	Etablierung der Array CGH zur Diagnostik der Intelligenzminderung	40
6.3	Gegenwärtiger Stellenwert der Array-CGH und zukünftige Ausblicke	43
6.4	Diskussion der Ergebnisse des eigenen Patientenkollektivs	45
7	Schlussfolgerung	47
8	Literaturverzeichnis	49
9	Abbildungsverzeichnis	56
10	Tabellenverzeichnis	57
11	Anhang	58

1 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit soll der Stellenwert der Array-CGH im Rahmen der ursächlichen Abklärung unklarer Intelligenzminderung und Entwicklungsverzögerung bei Kindern und Jugendlichen im Alter von 5 Monaten bis 19 Jahren herausgearbeitet werden. Dabei liegt der Schwerpunkt auf der Beurteilung der Effizienz und Sensitivität eines solchen Testverfahrens in einem Klinikum der Maximalversorgung, wo sich die Patienten „ungefiltert“ und ohne entsprechende Vordiagnostik in der klinisch-genetischen Sprechstunde vorstellen.

Bei den in dieser Dissertation beschriebenen Patienten handelt es sich um 50 Kinder mit psychomotorischer Entwicklungsverzögerung und Intelligenzminderung unterschiedlichen Ausmaßes sowie zusätzlichen phänotypischen Auffälligkeiten wie craniofazialen Dysmorphien, Fingerpads/Dermatoglyphen, Verhaltensauffälligkeiten, neurologischen und/oder orthopädische Auffälligkeiten. Die bisher durchgeführten (genetischen) Untersuchungen (u.a. Chromosomenanalyse, FISH, MLPA) dieser Patienten ließen keine kausale Diagnose des klinischen Erscheinungsbildes zu, sodass die Array-CGH zur Diagnosestellung zum Einsatz kam. Dabei wurde die Frage nach Kausalität der entsprechend detektierten Aberration in Bezug auf den vorliegenden Phänotyp mit Hilfe der Datenbanken UCSC, Decipher und ISCA sowie geeigneter Reviews analysiert, um die bis zu sechs Jahre alten Befunde zu reevaluieren. Dabei konnte herausgearbeitet werden, dass in 12% Prozent der Fälle die Array-CGH tatsächlich eine ursächliche Deletion/Duplikation im Genom der Patienten detektierte. Kinder mit pathologischen CNVs zeigten hierbei deutlich häufiger craniofaziale Dysmorphien, wie z.B. Mikrocephalie, als Kinder mit normalem Array-CGH Befund. Daher ist anzunehmen, dass die Array-CGH bei Patienten mit bisher ungeklärter Intelligenzminderung viel wahrscheinlicher pathologische Aberrationen detektieren wird, wenn sie entsprechende phänotypische Merkmale aufweisen.

In den letzten Jahren zeigte sich, dass die Anwendung von chromosomalen Mikroarray Analysen (CMA), zu welcher die Array-CGH zählt, die klinische Diagnostik bei Patienten mit idiopathischer Intelligenzminderung revolutioniert hat. Die Array-CGH gehört zum Goldstandard in der Diagnostik für Individuen mit ungeklärter Intelligenzminderung, Entwicklungsverzögerung, Autismus sowie Dysmorphien, denn in 10-20 % der Fälle werden mit dieser Methode klinisch relevante Kopienzahlvariationen (CNVs) ermittelt und die Beschreibung neuer Mikrodeletionen und -duplikationen im Zusammenhang mit idiopathischer Intelligenzstörung ermöglicht (Bartnik et al. 2013). Dennoch bleibt die Interpretation vieler gefundener CNVs in Bezug auf den klinischen Phänotyp zurzeit noch völlig unklar. Insbesondere dann, wenn die regulatorischen Einheiten von Genen betroffen sind.

Ziel ist es, durch das Betreiben von genetischen Datenbanken auf der ganzen Welt die Interpretation der Array Befunde zu erleichtern und die Zahl der unklaren Befunde zu minimieren.

2 Einleitung

2.1 Array-CGH

Bei der Array-CGH handelt es sich um eine vergleichende genomische Hybridisierung fluoreszenzmarkierter Patienten- und Kontroll-DNA auf einem Trägerchip (Array) mit DNA-Fragmenten. Man unterscheidet die Metaphasen-CGH von der Array-CGH, wobei in beiden Fällen extrahierte DNA (z.B. Oligonukleotide) eines Tumors oder Patienten als Untersuchungsmaterial genutzt wird. Die Patienten-DNA sowie die Referenz-DNA einer gesunden Kontrollperson werden jeweils mit einem fluoreszierenden Farbstoff, beispielsweise rot (Test) und grün (Kontrolle), markiert. Der Unterschied zwischen beiden Verfahren besteht darin, dass bei der Metaphasen-CGH die beiden genomischen DNA-Sonden gleichzeitig mit fixierten Metaphase-Chromosomen hybridisiert und anschließend fluoreszenzmikroskopisch analysiert werden, wohingegen die Hybridisierung bei der Array-CGH auf sogenannten Microarrays durchgeführt wird (Abbildung 1 und 2) (Murken et al. 2011). 1997 wurde die so genannte Matrix-CGH oder Array-CGH entwickelt, wobei die humanen Metaphasen als herkömmliche Hybridisierungsplattform durch definierte, kurze Fragmente normaler menschlicher DNA ersetzt wurden (Solinas-Toldo et al. 1997; Pinkel, D. et al. 1998). Das Auflösungsvermögen der Array-CGH schafft heutzutage die Möglichkeit der Detektion von CNVs, welche kleiner als 1 kb sind (Evangelidou et al. 2013). Die beiden DNA-Populationen werden 1:1 gemischt und auf einem präparierten Objektträger fixiert, z.B. Glas (Murken et al. 2011). Die Metaphasen CGH nutzt die Hybridisation auf normale, humane Metaphasen, wohingegen bei der Array CGH Oligonukleotide, cDNA oder BACs als hybridisierende Grundlage dienen. Zur Auswertung des Ergebnisses dient bei beiden CGH-Varianten das entstehende Hybridisierungsmuster.

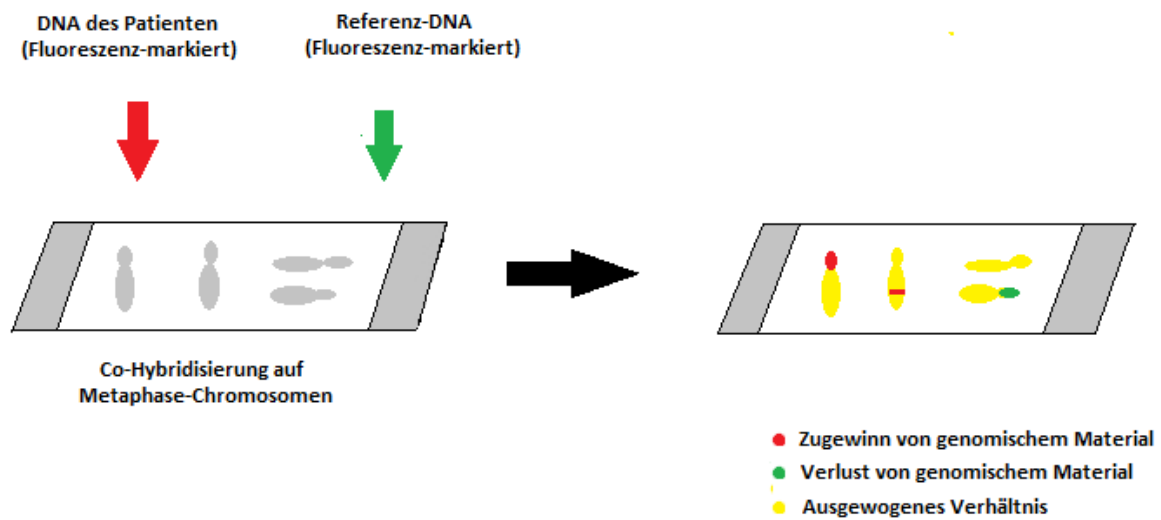


Abbildung 1: Übersicht Metaphasen-CGH (Mohrmann 2013)

Die Array-CGH hat sich in jüngster Zeit auch auf dem Gebiet der Abklärung, durch konventionell genetische Methoden nicht erfassbarer syndromaler Krankheitsbilder bewährt (Bergmann 2011). Beim Auftreten von unklaren psychomotorischen Entwicklungsstörungen und syndromalen Krankheitsbildern, die sich mit bisherigen Verfahren (Chromosomenanalyse, FISH, MLPA) nicht aufklären lassen, ist die Durchführung einer Array-CGH indiziert. Dadurch ist es möglich in 10 - 20 % dieser Fälle eine ätiologische Aufklärung zu erbringen und neben dem Informationsgewinn für den individuellen Kasus auch zu einem wissenschaftlichen Zugewinn, z.B. durch anonymisierte Aufnahme dieser Patienten in die DECIPHER-Datenbank, beizutragen (Miller et al. 2010). De Vries et al beschreiben in ihrer Studie vom Oktober 2005, dass die diagnostische Ausbeute der Array-CGH mindestens doppelt so hoch ist, wie die der GTG-Bänderung (de Vries et al 2005).

Tabelle 1 schafft einen Vergleich der Auflösungsvermögen von Chromosomenanalyse, FISH sowie Array-CGH.

Tabelle 1: Auflösungsvermögen ausgewählter zytogenetischer Darstellungsmethoden

Methode	Auflösung
konventionelle Chromosomenanalyse	6 – 10 Mb
konventionelle CGH	2 Mb
Metaphasen- FISH	100 kb
Interphase- FISH	20 kb
Array CGH	bis < 1kb *

* abhängig vom verwendeten Array (Simoni und Wieacker 2009)

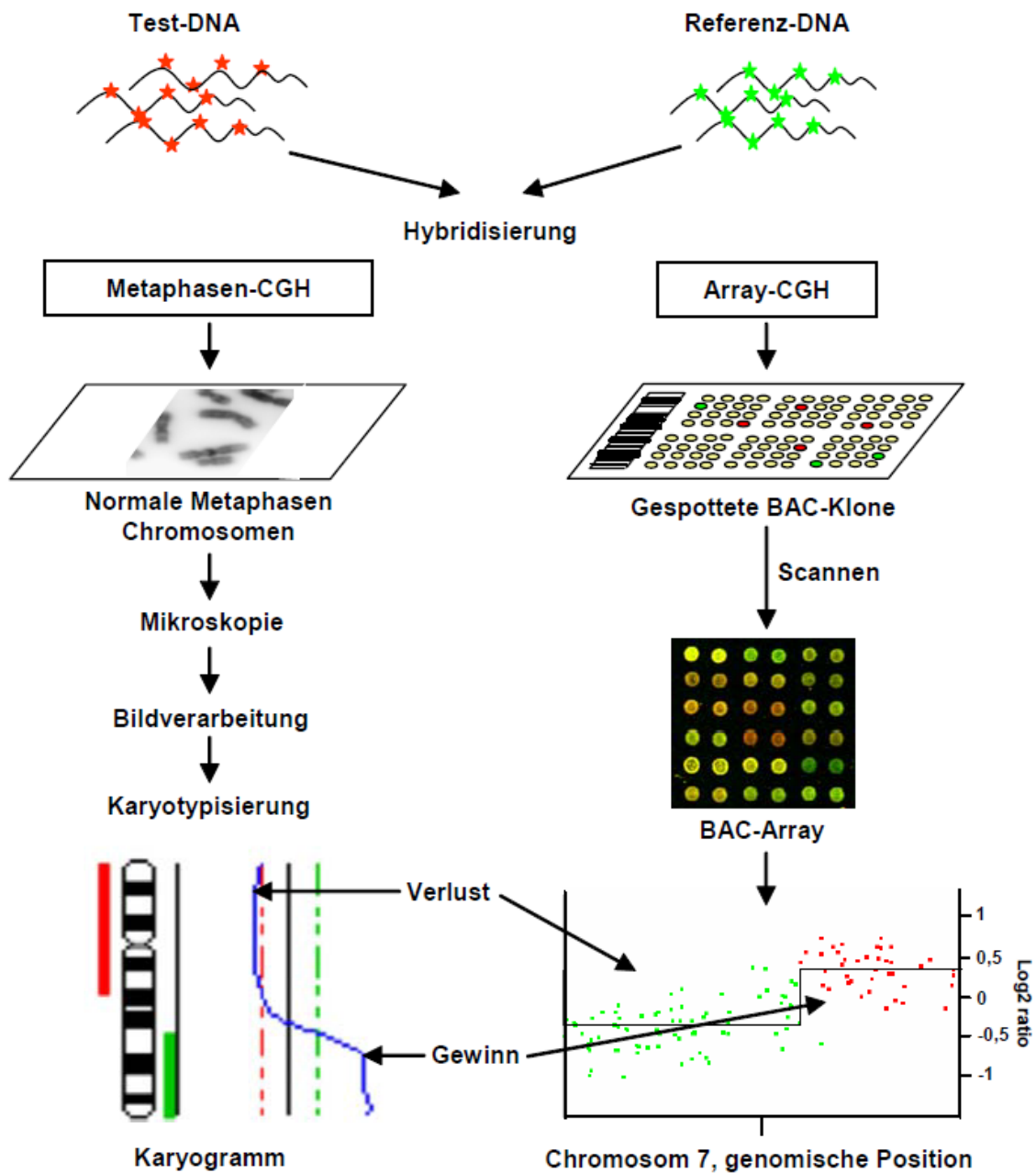


Abbildung 2: Schematische Übersicht der Metaphasen- und Array-CGH (Fuhrmann 2007)

2.2 Fragestellungen und Indikationen zum Einsatz der Array-CGH

2.2.1 Indikationskriterien chromosomaler Aberrationen im Rahmen postnataler Diagnostik

Die Voraussetzungen für die Abrechenbarkeit einer Mikroarray-Analyse auf Mikrodeletionen und Mikroduplikationen im Rahmen einer postnatalen molekularen Karyotypisierung nach dem einheitlichen Bewertungsmaßstab (EBM) der kassenärztlichen Bundesvereinigung (KBV) sind:

- *eine isolierte Intelligenzminderung (mindestens IQ kleiner 70), dokumentiert im Rahmen einer neuropädiatrischen und/oder entwicklungsneurologischen Vordiagnostik klinisch und/oder mit standardisierten Testverfahren - bei einem Menschen älter als 3 Jahre*
- *eine geistige Behinderung in Kombination mit dysmorphologischen Merkmalen mit Beteiligung von zwei oder mehr Systemen*
- *eine tiefgreifende Entwicklungsstörung des Autismus-Formenkreises oder eine Fehlbildung und schwere Funktionsstörung des Gehirns, die nicht einer bekannten Ursache zuzuordnen ist*
- *multiple angeborene Fehlbildungen postnatal*
- *multiple dysmorphologische Merkmale, die zytogenetisch nicht erfassbare chromosomale Aberrationen als Ursache implizieren*

(Einheitlicher Bewertungsmaßstab der kassenärztlichen Bundesvereinigung in der Fassung mit Wirkung vom 01. 01. 2015)

Dabei muss eines dieser definierten Indikationskriterien vorliegen, um die Berechnungsfähigkeit zu realisieren. Die geistige Entwicklungsstörung ungeklärter Ätiologie wird von der KBV mit der Gebührenordnungsposition 11500 verschlüsselt. Der damit verbundene obligate Leistungsinhalt ist die Untersuchung auf Mikrodeletionen und Mikroduplikationen mittels Mikroarray-Analyse, wobei die gesamtgenomische Auflösung des Arrays ca. 200kb oder besser betragen sollte (Kohlhase 2013).

2.2.2 Klärung der Ätiologie neurokognitiver Entwicklungsstörungen

In der genetischen Sprechstunde stellen neurokognitive Entwicklungsstörungen einen großen Schwerpunkt dar, denn sie betreffen 2-3 % der Bevölkerung (Oneda und Rauch 2012). Die Frage nach der Ätiologie ist von immenser Bedeutung, da nur so eine Aussage über Prognose, therapeutische Möglichkeiten und Wiederholungsrisiko getroffen werden kann. Die Array-CGH lieferte in den letzten Jahren einen entscheidenden Beitrag in der Diagnostik solcher Störungen und ermöglicht die Definition neuer Krankheitsbilder.

Leider bleibt in der Mehrzahl der Fälle die Ursache der neurokognitiven Störung ungeklärt. Dies ist grafisch in Abbildung 3 dargestellt. Dennoch ist davon auszugehen, dass häufig eine

genetische Ätiologie vorliegt, da nur in 1-2 % der Fälle exogen Noxen ausgemacht werden können (Rauch et al 2006). Mit 7-9 % der Patienten mit Intelligenzminderung stellt die Trisomie 21 die Ursache für die neurokognitive Entwicklungsstörung dar, gefolgt von anderen chromosomalen Aberrationen oder Aneusomien mit 3-5 % der Fälle und bei 0,6 % findet man balancierte strukturelle Aberrationen wie Translokationen oder Inversionen (Rauch und Oneda 2012).

Bei etwa 5 % der Patienten liegen klinisch gut detektierbare Mikrodeletionssyndrome wie z.B. das Williams-Beuren- oder DiGeorge Syndrom vor und ungefähr bei 0,3 % kann eine uniparentale Disomie gefunden werden (Oneda und Rauch 2012). Monogenetische Ursachen lassen sich nach klinischem Verdacht derzeit bei etwa 5-10 % der Patienten nachweisen, sodass ohne den Einsatz von Screeningmethoden 2/3 der Fälle ungelöst bleiben (Rauch et al 2006). Dank der Analysen mittels Array-CGH lassen sich ein signifikanter Anteil an Mikrodeletionssyndromen und Kopienzahlvariationen im Zusammenhang mit neurokognitiven Entwicklungsstörungen erfassen. Entscheidend für die Erfolgsrate dieser genetischen Untersuchung ist die Auswahl der Patienten, deren bereits statt gefundene Voruntersuchungen und selbstverständlich die Auflösung der verwendeten Array-Technik. Bei unselektierten Patienten mit unauffälligem Karyotyp zeigte 2011 eine Metaanalyse von 50 publizierten Studien zur Detektionsrate von Array-Analysen von Hochstenbach et al. eine Detektionsrate von 10 (Oligonukleotidarrays mit mittlerem Probenabstand von 30-70 kb) -14 % (SNP-Arrays mit mittlerem Probenabstand von 6-12 kb). Wenn eine klare klinische Verdachtsdiagnose fehlt, stellt die molekulare Karyotypisierung mittels Oligonukleotid- oder SNP-Arrays derzeit das effektivste Diagnostikwerkzeug zur Abklärung neurokognitiver Entwicklungsstörungen dar (Prof. Dr. Gillessen-Kaesbach und Prof. Dr. Siebert 2012).

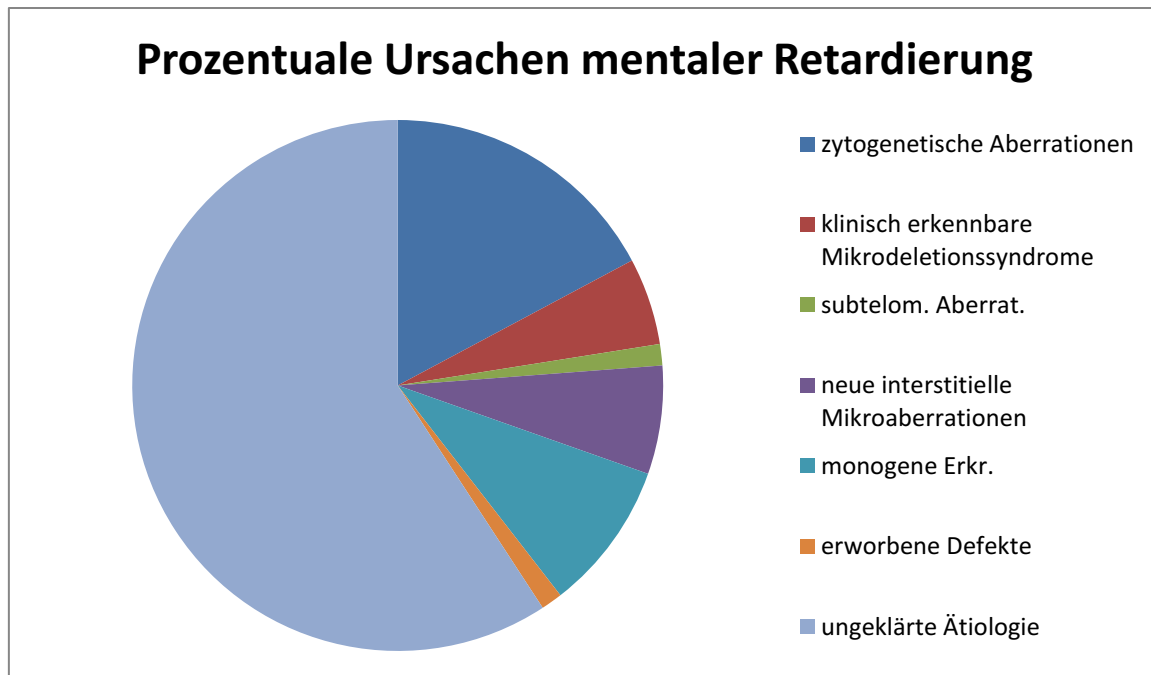


Abbildung 3: Prozentuale Ursachen mentaler Retardierung (modifiziert nach Rauch 2008)

Der Begriff der mentalen Retardierung sollte heute nicht mehr verwendet, sondern stattdessen durch das Wort Intelligenzminderung ersetzt werden. Dennoch werden beide Begriffe oftmals noch synonym gebraucht. Der ICD-10 thematisiert den Begriff „Intelligenzstörung“ im Kapitel V „Psychische und Verhaltensstörungen“ unter F70 bis F79 als „ein[en] Zustand von verzögerter oder unvollständiger Entwicklung der geistigen Fähigkeiten; besonders beeinträchtigt sind Fertigkeiten, die sich in der Entwicklungsperiode manifestieren und die zum Intelligenzniveau beitragen, wie Kognition, Sprache, motorische und soziale Fähigkeiten. Eine Intelligenzstörung kann allein oder zusammen mit jeder anderen psychischen oder körperlichen Störung auftreten (ICD-10 GM Version 2013)“. Der Schweregrad einer Intelligenzstörung wird durch standardisierte Intelligenztests ermittelt. Die Messmethoden erlauben eine ziemlich genaue Beurteilung der Intelligenzminderung, wobei die Diagnose auch von der Einschätzung der allgemeinen intellektuellen Funktionsfähigkeit durch einen erfahrenen Diagnostiker abhängt. Mit Hilfe von Übungen und durch Rehabilitation können sich intellektuelle Fähigkeiten unter Umständen verbessern und das Sozialverhalten verändern. Dies kann zwar nur in einem geringen Ausmaß der Fall sein, dennoch muss die Diagnose sich immer auf das gegenwärtige Funktionsniveau beziehen. Bei Kleinkindern wird zunächst noch von einem Entwicklungsrückstand oder einer Entwicklungsverzögerung gesprochen und erst mit dem Beginn des Jugendalters von Intelligenzminderung. Dabei dient der Intelligenzquotient (IQ) als globales Maß für die kognitive Leistungsfähigkeit eines Menschen. Tabelle 2 zeigt die Klassifikation der Intelligenzminderung bezogen auf den IQ-Wert, den entsprechenden

ICD-10 Code und die Verteilung in der Bevölkerung (modifiziert nach PD Dr. Noterdaeme und Enders 2008).

Tabelle 2: Klassifikation der Intelligenzminderung

Intelligenzminderung	ICD-10	IQ	Anteil
leichte	F70	70-50	80%
mittelgradige	F71	49-35	12%
schwere	F72	34-20	7%
schwerste	F73	<19	<1%

2.2.3 Vor- und Nachteile Array CGH

Zahlreiche genomische Veränderungen können bereits mit Hilfe zytogenetischer Standardverfahren aufgedeckt werden. Dazu gehören Trisomien sowie größere (> 10Mb) Deletionen und Duplikationen, wie z.B. das Cri-du-Chat- und Wolf-Hirschhorn-Syndrom. Nichtsdestotrotz wird eine Standard-Karyotypanalyse, in Abhängigkeit des Bandenstadiums, nicht in der Lage sein, Deletionen oder Duplikationen, welche kleiner als 5 - 10 Mb sind, zu identifizieren (Cheung et al 2005). Die klassische Zytogenetik weist eine Detektionsrate lichtmikroskopisch sichtbare Veränderungen von ungefähr 5 % für Patienten mit mentaler Retardierung und craniofazialen Dysmorphien auf (de Vries et al 2005).

Schon die Entwicklung lokus-spezifischer FISH-Sonden verbesserte die Sensitivität zytogenetischer Analysen enorm. Vor allem die Verwendung von Sonden für subtelomere und klinisch relevante telomere Regionen sowie der Einsatz der MLPA führten zu einer Detektionsrate von kryptischen unbalancierten Aberrationen in ca. 6% der Fälle mit Lernbehinderung und mentaler Retardierung unbekannter Ursache (de Vries et al 2005). Dennoch handelt es sich bei dieser Methode um ein sehr zeitaufwändiges Verfahren, womit zudem keine Angabe über die Ausdehnung der Aberration getroffen werden kann, da jeweils nur eine Sonde für jede Region verwendet wird. Das schließt zudem die Tatsache ein, dass nicht das gesamte Genom, wie bei der Array CGH auf genomische Veränderungen gescreent werden kann, sondern jeweils nur der spezifische Lokus der eingesetzten Sonde aufgrund eines klinischen Verdachts.

Daraus ergeben sich die Hauptvorteile der Array CGH (Sireteanu et al 2012; Cheung et al 2005):

- detaillierte Begutachtung klinisch relevanter genomischer Regionen hinsichtlich Größe der Aberration, genaue Lokalisation der Bruchpunkte, Ursprung des zusätzlichen genetischen Materials
- Ermittlung neuer Kandidatengene in der befundeten Region und damit Beschreibung neuer Mikrodeletions-/Mikroduplikationssyndrome
- die Fähigkeit unzählige Deletions- und Duplikationssyndrome in einem einzigen Analyseschritt zu testen
- das Überwinden der Auflösungsgrenzen lokusspezifischer Verfahren
- das Erkennen submikroskopischer Kopienzahlveränderungen innerhalb des gesamten Genoms
- schnelles Verfahren, da eine zeitaufwändige Kultivierung von Zellen entfällt
- Detektionsrate von 10% bei mental retardierten Patienten

Eine vergleichende Darstellung der Detektionsgrenzen zeigt Tabelle 3.

Die Nachteile/Grenzen der Array-CGH stellen sich wie folgt dar:

- die Unfähigkeit balancierte Translokationen sowie low level Mosaik zu erkennen
- teure Methode
- die Interpretation der detektierten Veränderungen stellt oftmals eine Herausforderung dar

Dennoch sprechen Sireteanu et al 2012 davon, dass die Array CGH das Potential besitzt, die Karyotyp-Analyse als primären zytogenetischen Test zu ersetzen. Dies wird allerdings vorerst nicht der Fall sein und auch die FISH-Diagnostik mit der Möglichkeit des Nachweises balancierter Translokationen wird sobald nicht durch die Array-CGH ersetzt werden können. Tabelle 3 zeigt die Detektionsraten mentaler Retardierung im Vergleich (de Vries et al 2005).

Tabelle 3: Detektionsrate verschiedener Methoden für die Ursachen mentaler Retardierung

	Karyotypanalyse	FISH	Array-CGH
Detektionsrate Ursachen mentaler Retardierung	~ 5 %	~ 6%	~ 10%

Sehr oft werden jedoch sogenannte Kopienzahlvariationen (CNVs) bei der Array-CGH Untersuchung detektiert, wobei deren Pathogenität oftmals unklar ist.

2.3 Kopienzahlvariationen (Copy Number Variationen/CNV)

Kopienzahlvariationen (CNVs) bezeichnen quantitative Abweichungen eines bestimmten Bereiches im Genom (z.B. Deletionen, Duplikationen), die nicht zwangsläufig mit einem klinisch auffälligen Phänotyp einhergehen müssen (Conrad et al 2010). Definiert wird eine Kopienzahlvariation als ein DNA-Segment größer als 1 kb mit einer variablen Kopienzahl im Vergleich zu einem Referenz-Genom (Freeman et al 2007). Sie können bis zu mehreren Millionen Basenpaaren lang sein (Simoni und Wieacker 2009). Diese Beschreibung einer CNV nimmt keinen Bezug auf die klinischen Auswirkungen der entsprechenden genomischen Imbalance und kann für die Kliniker unter Umständen verwirrend sein, da unter einer Variation generell keine pathologisch relevante Alteration verstanden wird. Daher werden meist die Begriffe „pathologische CNV“, „benigne CNV“, und „CNV unklarer klinischer Relevanz“ benutzt. CNVs, die kritische Regionen bekannter Mikrodeletions- oder Mikroduplikationssyndrome (oder auch andere Regionen mit entsprechender klinischer Relevanz, wie z.B. Subtelomerbereiche) überspannen, gelten als „wahrscheinlich pathogen“ (Lee et al 2007). Ist die Pathogenität der CNV initial unklar, sollte das Bestreben des klinischen Zytogenetikers sein, herauszufinden, ob die CNV de novo entstanden oder hereditär ist. Sollte die CNV sowohl beim nicht betroffenen Elternteil, als auch beim betroffenen Kind vorhanden sein und ist die Aberration nicht als krankheitsverursachend in einer Datenbank aufgeführt, so ist eher von einer benignen CNV auszugehen (Lee et al 2007). Schätzungsweise treten de novo CNV mit einer Rate von $1,2 \times 10^{-2}$ pro Vererbung von Eltern auf das Kind auf (Itsara et al. 2009). Doch nur, weil eine CNV de novo aufgetreten ist, heißt es nicht, dass diese zwangsläufig pathogen ist. Unbedingt notwendig für die Interpretation der CNV ist der Nachweis des funktionalen Einflusses der Aberration auf ein Gen, das in Zusammenhang mit Intelligenzminderung steht oder ein eindeutiger Zusammenhang zwischen dem Phänotyp des Betroffenen und anderen Patienten mit derselben Aberration und ähnlichem Phänotyp. CNVs spielen eine entscheidende Rolle in der Evolution und werden neben dem Auftreten mentaler Retardierung auch mit dem Entstehen multifaktorieller Erkrankungen wie beispielsweise

Psoriasis, Adipositas und Osteoporose in Verbindung gebracht (Conrad et al 2010). Ebenso scheinen CNVs eine kausale Rolle bei den Krankheitsbildern der Schizophrenie und des Autismus zu spielen, wobei die genauen Mechanismen, die zum Auslösen der entsprechenden Krankheit führen sehr komplex sind (Cook und Scherer 2008). Interessanterweise tragen bestimmte CNVs auch zu einer Prädisposition für Infektionskrankheiten wie HIV oder Glomerulonephritis bei (Redon et al 2006). Solange gegenwertig keine kausale Assoziation mit bestimmten Erkrankungen nachgewiesen werden kann, werden diese Veränderungen als “benigne“ angesehen. Die Database of Genomic Variants listete 2010 67000 bekannte CNVs, welche sowohl benigne als auch pathogene und unklassifizierte Varianten beinhalten. Redon et al fertigten 2006 erstmals eine „CNV-Übersichtskarte“ des menschlichen Genoms anhand einer Studie mit 270 Individuen mit Herkunft aus Europa, Asien und Afrika an. Insgesamt wurden so 1447 CNVs detektiert. Es zeigte sich dabei, dass kleinere Deletionen ($< 20\text{kb}$) häufiger vorkommen als größere ($> 20\text{kb}$). Selbiges scheint auch auf Duplikationen übertragbar.

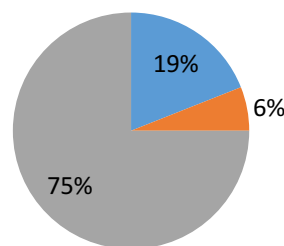
Palmer et al analysierten 2010 67 Personen mit mentaler Retardierung unklarer Ätiologie mit hochauflösenden Arrays (Affymetrix 2.7 M Oligo, und SNP, 50kb Auflösung). Insgesamt wurden 301 CNVs detektiert, wobei 19% als wahrscheinlich pathologisch, 6% als benigne und 75% als unklar bewertet wurden. Nur zwei Jahre später wurden diese Ergebnisse der Kohorte von Palmer et al erneut analysiert und ein signifikanter Unterschied in der Bewertung der individuellen CNVs festgestellt. Es ließen sich 2012 bereits 31% potentiell pathologische CNVs zuordnen und ebenso konnten deutlich mehr „prädispositionierende“ CNVs detektiert werden, was grafisch in Abbildung 4 deutlich wird (Palmer et al 2014). Dies sind CNVs, welche mit höherer Frequenz in Kohorten mit neurokognitiven Störungen nachgewiesen werden als in einer gesunden Kontrollgruppe. Derartige CNVs werden als prädisponierend für bestimmte Krankheitsbilder angesehen, aber nicht als alleiniger auslösender Faktor. Gründe für die unterschiedliche Interpretation der CNVs innerhalb so kurzer Zeit sehen Palmer et al u.a. in neuer Literatur, die die phänotypischen Konsequenzen bestimmter CNVs beschreibt, die Beschreibung neuer Kandidatengene, monogenetische Ursachen für neurokognitive Störungen, genomweite Studien mit Hilfe des Next- Generation- Sequencings, die Überarbeitung der Genlokalisierung in hg19 sowie die Verbesserung der Informationen über pathologische und Kontrollpopulationen in Datenbanken wie Decipher, ISCA und DGV. Palmer et al konnten damit zeigen, dass sich die Interpretation von CNVs, vor allem aber auch die Kombination mehrerer kleinerer CNVs, über kurze Zeit signifikant verändern kann.

Die Interpretation von CNVs ist limitiert durch das fehlende Verständnis über die funktionellen Auswirkungen seltener CNVs (Palmer et al 2014). Die Interpretation von CNVs wird auch

dadurch erschwert, dass einige Studien auch bei gesunden große Kopienzahlvariationen nachgewiesen haben (Iafrate et al. 2004; Sebat et al. 2004). Wie viel solche CNVs zur individuellen genetischen sowie phänotypischen Diversität beitragen ist aktuell noch unklar. Die Detektionsrate von pathogenetischen CNVs kann dabei beeinflusst werden durch eine gewisse Vorselektion der Patienten sowie dem mittleren Probenabstand der Array-Plattform (Preiksaitiene et al 2014).

Interpretation der Array CGH Ergebnisse 2010

■ pathogenetischer Befund ■ benigner Befund ■ unklarer Befund



Interpretation der Array CGH Ergebnisse 2012

■ pathogenetischer Befund ■ benigner Befund ■ unklarer Befund

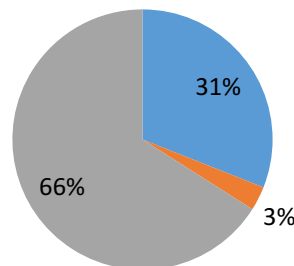


Abbildung 4: Vergleich der Klassifikation individueller Patienten-Arrays 2010 und 2012 (modifiziert nach Palmer et al 2014)

2.4 Zusammenhänge zwischen CNVs und Phänotyp

Die derzeitige Hauptursache für Intelligenzminderungen und/oder kongenitale komplexe Anomalien stellen chromosomale Aberrationen, wie beispielsweise CNVs, dar. Deswegen stellt der klinische Gebrauch genomweiter chromosomaler Mikroarray- Technologien eine Revolution in der Diagnostik bei Patienten mit syndromaler und nicht syndromaler Intelligenzminderung dar.

Die steigende Anzahl genomischer Daten zeigt die Komplexität der Beziehung zwischen Genotyp und Phänotyp auf und verlangt eine detailliertere Aufzeichnung und Vervielfältigung der Daten. Nur so kann der Bezug zwischen phänotypischen Auffälligkeiten und

krankheitsverursachenden CNVs hergestellt werden. Preiksaitiene et al 2014 betonen, dass ein Kliniker, der auf spezifische phänotypische Merkmale achtet, die diagnostische Treffsicherheit bei Patienten mit Intelligenzminderung von 17,2% auf 34,2% erhöhen kann. Dies ist keinesfalls trivial, denn die klinischen Charakteristika der einzelnen Mikrodeletions- sowie Mikroduplikationssyndrome sind hochkomplex und verschieden. Ziel ist es letztlich, einen Katalog an charakteristischen phänotypischen Auffälligkeiten in Verbindung mit den entsprechenden CNVs zu erweitern und zu erörtern, welche äußeren Merkmale als Indikator für pathologische CNVs gelten können. Daher hilft die klinische und molekulargenetische Analyse von Patienten mit Intelligenzminderung phänotypische Hinweise aufzuzeigen und pathologische CNVs zu detektieren. Dies ist vor allem wünschenswert, weil die Array-CGH Diagnostik teuer und aufwändig für das Labor ist und Kriterien, die die Trennschärfe für Patienten mit höchstwahrscheinlich pathogenen CNVs erhöhen, die Diagnostik für Patient und Kliniker erleichtern.

2.5 Effekte und Relevanz der CNV-Ausdehnung und -Anzahl

CNV Analysen aus dem Genom zahlreicher Patienten zeigen, dass der Krankheitstyp und der Schweregrad vermutlich zurückzuführen ist auf bestimmte Vererbungsmuster innerhalb der Familien sowie zusätzliche seltene genetische Ereignisse. Verbreitete CNV-Polymorphismen prädisponieren bestimmte Chromosomen für immer wiederkehrende Deletionen und Duplikationen, wobei dieselbe genomische Läsion mit sehr unterschiedlichen Phänotypen behaftet sein kann (Girirajan und Eichler 2010). Es gibt zahlreiche Erklärungsansätze, warum die Phänotypen derselben Aberration so divergieren können. Zum einen sind die Bruchpunkte innerhalb der Läsion oftmals unterschiedlich, zum anderen beeinflusst die Größe der CNV ebenso den Phänotyp. Weiterhin kann ein einziger Nukleotidwechsel in der Nähe der CNV das Expressionsmuster des Gens verändern und damit den Phänotyp beeinflussen. Manchmal spielt auch ein Gen innerhalb der betroffenen Region die entscheidende Rolle für den Phänotyp, wobei mehrere weitere Gene die Variabilität ausmachen, wie z.B. beim Smith-Magenis-Syndrom. Zudem spielen Imprinting und „second-hits“ eine Rolle für das Ausmaß der phänotypischen Ausprägung. Vermutlich ist die erste Veränderung in der Lage einige neuropsychiatrische Eigenschaften auszulösen, aber der zweite „Schlag“ steigert den Schweregrad der Erkrankung massiv, verbunden mit Intelligenzminderung und Entwicklungsverzögerung. Obwohl Kopienzahlvariationen einen Risikofaktor für bestimmte Krankheiten darstellen, ist ihr alleiniges Vorhandensein nicht ausreichend, um zu einem spezifischen Krankheitsbild zu führen. Diese Tatsache führt zu der Hypothese, dass zusätzliche

Risikofaktoren vorhanden sein müssen, die einen pathogenen Effekt im Organismus hervorrufen (Girirajan et al 2012).

Der Median für die Größe von CNVs in der Normalbevölkerung liegt bei 2,9kb, wobei 95% kleiner als 100kb sind. Dagegen treten größere CNV über 500kb nur bei 10% der Kontrollpersonen auf, aber bei Patienten mit neuropsychologischer Entwicklungsverzögerung in über 13,5% der Fälle (Asadollahi et al 2014). Das Krankheitsrisiko steigt mit der Größe der CNV (>400 kb) (Cooper et al 2011).

Die Daten dieser jüngsten Studien sind relevant für Kliniker und Forscher. Sie geben neue Einblicke in die Rolle der Größe und Kombination von CNVs mit Auswirkungen auf den Phänotyp. Dies eröffnet neue Möglichkeiten in der genetischen Diagnostik durch besseres Verständnis der Testergebnisse und Beschreibung neuer Mikrodeletions- und -duplikationssyndrome.

2.6 Mikrodeletionssyndrome/Mikroduplikationssyndrome

Der zunehmende Einsatz von Gesamt-Genom-Analysen auf Grundlage der Array-CGH in Diagnostik und Forschung hat zu einer kontinuierlich zunehmenden Anzahl an Mikrodeletions- und Mikroduplikationssyndromen geführt. Dies spiegelt sich in der immer noch steigenden Anzahl von Publikationen wider. Dies ist in Abbildung 6 ersichtlich. In den Jahren 1990 bis 2011 erschienen 200 Veröffentlichungen bezüglich Mikrodeletions-/Mikroduplikationssyndromen (Weise et al 2012). Unter einer Mikrodeletion/-duplikation wird eine Deletion/Duplikation eines Chromosoms verstanden, welche durchschnittlich weniger als 5 Millionen Basenpaaren umfasst (Murken et al 2011). Die Stückverluste/-zugewinne der Chromosomen sind so klein, dass sie mikroskopisch nur durch spezielle Techniken (z.B. FISH) nachgewiesen werden können. Klinisch können solche Verluste oder Zugewinne von genetischem Material ohne Auswirkung bleiben oder aber zu milden bis hin zu komplexen Syndromen führen. Mittlerweile ist bekannt, dass bei einigen dieser Syndrome in der duplizierten bzw. deletierten Region mehrere Gene involviert sind, aber oftmals nur eines von diesen Genen Dosis-sensitiv ist und ursächlich für das entsprechende klinische Erscheinungsbild (Weise et al 2012). Aus diesem Grund wird die Bezeichnung „Contiguous-Gene-Syndrome“ aktuell synonym mit dem Begriff Mikrodeletions-/Mikroduplikationssyndrom verwendet. In den allermeisten Fällen gehen solche Syndrome mit mentaler Retardierung einher. Die Abbildung 5 zeigt einige ausgewählte Beispiele derartiger Syndrome.

Syndrom	Locus	Inzidenz	Phänotyp
Angelman-Syndrom OMIM 105830	15q11-q13	1:16.000- 1:20.000	Schwere <u>psychomotorische Retardierung</u> , Lachepisoden, EEG-Auffälligkeiten
Cri-du-chat-Syndrom OMIM 123450	5p15.2- p15.3	1:50.000	Schwere <u>psychomotorische Retardierung</u> , Minderwuchs, katzenartiges Schreien im Säuglingsalter
DiGeorge-Syndrom OMIM 188400	22q11.2	1:4.000	<u>Psychomotorische Retardierung</u> , typische Fazies, konotrunkale Herzfehler, Thymusaplasie, Hypokalzämie
Miller-Dieker-Syndrom OMIM 247200	17p13.3	<1:20.000	Lissenzephalie, schwere <u>psychomotorische Retardierung</u> , Muskelhyper-/ hypotonus, Krampfanfälle
Prader-Willi-Syndrom OMIM 176270	15q11-q13	1:15.000	Leichte <u>mentale Retardierung</u> anf. Gedeihstörung, Minderwuchs, Muskelhypotonie, Hypogonadismus, sp. Adipositas
Shprintzen-Syndrom OMIM 192430	22q11.2	1:4.000	<u>Psychomotorische Retardierung</u> , Herzfehler, typische Fazies, Verhaltensauffälligkeiten
Smith-Magenis-Syndrom OMIM 182290	17p11.2	1:25.000	<u>Psychomotorische Retardierung</u> , Herzfehler, Verhaltensauffälligkeiten, Schlafstörungen
Williams-Beuren-Syndrom OMIM 194050	7q11.23	1:10.000	<u>Psychomot. Retard.</u> , supralvalvuläre Aortenstenose, Minderwuchs, Muskelhypotonie, Mikrodontie, Hyperkalzämie
Wolf-Hirschhorn-Syndrom OMIM 194190	4p16.3	1:50.000	Schwere <u>psychomotorische Retardierung</u> , Iris-Kolobome, LKG-Spalte, Herz-/Nierenfehlbildungen, Krampfleiden, Hypospadie

Abbildung 5: Überblick einiger Mikrodeletionssyndrome (modifiziert nach Vissers et al 2010 und Rost 2000)

Die Grundlage für die Entstehung solcher Syndrome liegt in der Konstruktion des menschlichen Genoms selbst. Zahlreiche repetitive Sequenzen dienen als Grundlage für intra- und interchromosomale Umlagerungen sowohl in der Mitose als auch in der Meiose (Weise et al 2012).

Da der Ablauf dieser Prozesse zufällig geschieht, müsste es theoretisch in etwa ebenso viele Mikrodeletionssyndrome wie Mikroduplikationssyndrome geben. Dennoch sind derzeit 211 Mikrodeletionssyndrome und nur 79 Mikroduplikationssyndrome beschrieben (Weise et al 2012). Dafür verantwortlich scheinen mehrere Gründe zu sein, die in ihrer Komplexität noch nicht vollständig verstanden sind. Bekannt ist, dass meiotische Fehler bezüglich Duplikation sowie Deletion mit ähnlicher Häufigkeit auftreten müssten, dennoch Deletionen in der frühen Selektion während der Gametogenese „favourisiert“ werden (Turner et al 2008). Außerdem erscheinen Mikroduplikationen klinisch oftmals milder bzw. ohne relevante phänotypische Auffälligkeiten im Vergleich zum reziproken Mikrodeletionssyndrom. Dies lässt sich auch auf chromosomaler Ebene nachvollziehen, wobei Trisomien besser toleriert werden als Monosomien (Hirsch-Kauffmann et al 2009).

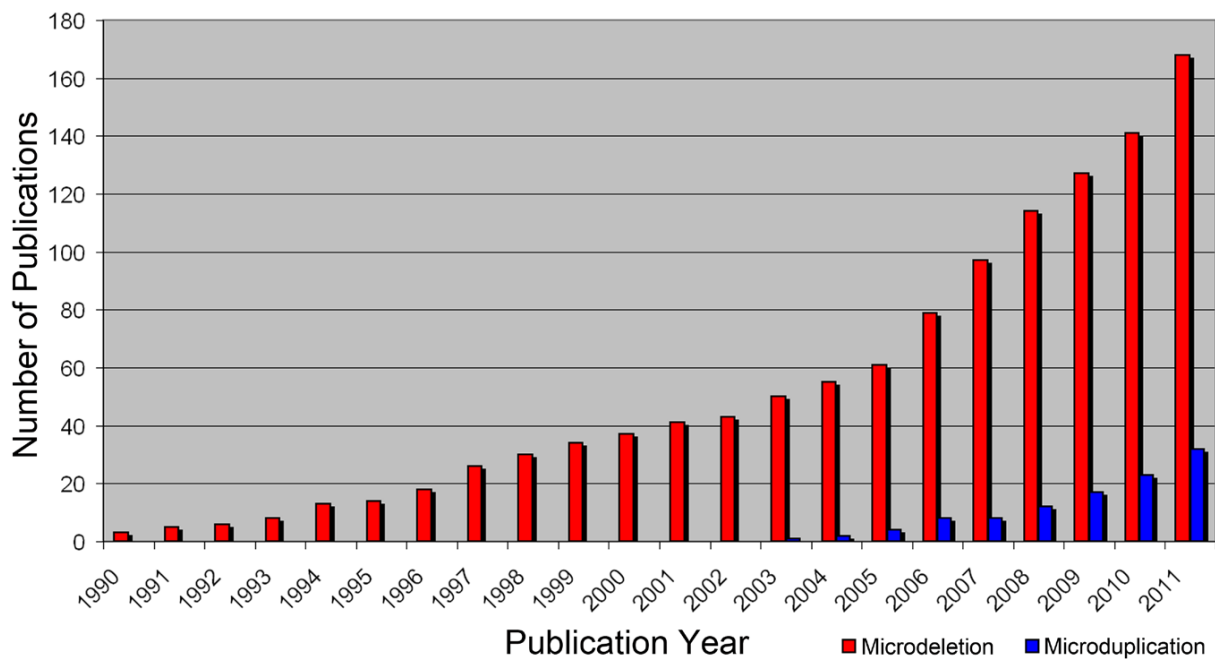


Abbildung 6: Grafik über die Zunahme der Publikationen zum Thema Mikrodeletionen und Mikroduplikationen während des Zeitraumes 1990 bis 2011 (Weise et al 2012)

3 Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit thematisiert Kinder mit psychischer und/oder physischer Entwicklungsverzögerung, bei denen die konventionelle genetische Diagnostik keine pathologischen Ergebnisse erbracht hat, sondern erst der Einsatz der Array CGH eine Hilfeleistung bei der Diagnosestellung geben konnte. Dabei soll herausgearbeitet werden, bei wie vielen Kindern aus der genetisch klinischen Sprechstunde eines Klinikums der Maximalversorgung diese Methode einen positiven Befund lieferte und wie häufig dies in direktem kausalem Zusammenhang mit dem klinischen Krankheitsbild steht. Gesucht wird hierbei nach statistisch signifikanten Unterschieden bestimmter Merkmale innerhalb der Patienten mit einem positiven Array-CGH Befund und solchen mit einem unauffälligen Befund. Dadurch kann dem Kliniker die Entscheidung, die eine entsprechende Diagnostik zur Folge hat, erleichtert und das Augenmerk auf eventuell charakteristische, phänotypische Merkmale, Symptomkomplexe oder Verhaltensweisen gelegt werden. Letztlich ermöglicht dies einen zielgerichteten Einsatz dieses immer noch sehr kostspieligen Testverfahrens.

Die Ursache einer mentalen Retardierung zu erfassen, verbessert die weitere klinische Betreuung des Patienten sowie die genetische Beratung der Familien. Beispielhaft werden diesbezüglich Einzelkasuistiken mit der Fragestellung analysiert, inwieweit anhand von Veränderungen einzelner Gene (Deletion, Duplikation) auf eine spezifische klinische Symptomatik, die Prognose und gegebenenfalls spezifische Behandlungsansätze geschlossen werden kann.

Alle Daten stammen aus dem Patientengut des SRH Waldklinikums Gera, Allgemeine Pädiatrie und werden mit bereits erhobenen Daten aus der Literatur sowie Patientendaten des humangenetischen Instituts der Universitätsklinik Jena vergleichend analysiert.

Das Patientenkollektiv ist mit 50 Patienten recht klein, doch waren zum Zeitpunkt der Datenerhebung nicht mehr pädiatrische Patienten des SRH Waldklinikums Gera mit der Array-CGH untersucht worden. Diese Arbeit spiegelt daher vor allem den Stellenwert einer solch speziellen Diagnostik in einem „einfachen“ Krankenhaus der Maximalversorgung, wieder.

4 Material und Methodik

4.1 Art der Arbeit

Um die Frage nach der Relevanz der Array-CGH Diagnostik für *ein* Krankenhaus im Rahmen einer klinisch genetischen Sprechstunde zu klären, wird im Folgenden anhand von bereits erstellten genetischen Befunden mittels Array-CGH bei 50 Kindern mit mentaler Retardierung eine Aufarbeitung dieser Befunde vorgenommen. Dabei wird die Frage nach Kausalität der entsprechend detektierten Aberration in Bezug auf den vorliegenden Phänotyp mit Hilfe der Datenbanken UCSC, Decipher und ISCA erneut analysiert, um die bis zu sechs Jahre alten Befunde zu reevaluieren. Anhand von Reviews der Literaturdatenbank PubMed und geeigneter Berichte diverser klinischer Zeitschriften wird die Überarbeitung der Befunde unterstützt. Tabellarische Übersichten sowie diverse Grafiken geben eine kompakte Übersicht über die wichtigsten Aspekte der Arbeit.

4.2 Studienkollektiv

Als Material dienten die Patientenakten von 50 Kindern mit mentaler Retardierung in Verbindung mit craniofazialen Dysmorphien, Fingerpads, pathologischen Dermatoglyphen, Verhaltensauffälligkeiten sowie pathologischen neurologischen und/oder orthopädischen Befunden der humangenetischen Sprechstunde von Prof. Seidel (ehemaliger Chefarzt der Kinderklinik Gera). Craniofaziale Dysmorphien wie z.B. tiefliegende Augen, große Ohren, breite Nasenwurzel, hohe Stirn, etc. können diagnostisch bedeutsam sein, wenn sie kombiniert in einem bestimmten Muster auftreten. Sie können familiärentypisch sein oder aber Leitsymptom eines bestimmten genetischen Syndroms sein (Speer und Gahr 2001). Dermatoglyphen sind Hautleisten auf den Fingern, in der Handfläche, an den Zehen und an der Fußsohle eines jeden Menschen, welche genetisch bestimmt und bei jedem Menschen anders ausgebildet sind. Als Fingerpad bezeichnet man eine kissenartige Auftreibung der Fingerbeere (Speer und Gahr 2001). Fehlende oder unzureichende Befunde wurden vom humangenetischen Institut Freiburg angefordert, von dem der Großteil der Befunde stammt. Alle relevanten Daten und Befunde

wurden aus den Akten übernommen, sowie diverse Übersichten und Diagramme mit Hilfe der Programme Microsoft Excel sowie SPSS erstellt. Das Studienkollektiv umfasst Kinder und Jugendliche der Geburtsjahrgänge 1990 bis 2011, die sich in den Jahren 2006 bis 2010 in der genetischen Sprechstunde im Klinikum Gera vorstellten. Das Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung ist im Mittel 6 Jahre, der Median beträgt 4,6 Jahre. Der älteste Patient des Studienkollektivs ist 19 Jahre, allerdings mit negativem (unauffälligem) Testbefund, der Jüngste ist 0,4 Jahre (5 Monate) und zeigte einen krankheitsursächlichen Befund. Die Standardabweichung lautet 4,5 Jahre. Im nächsten Abschnitt sind die erhobenen Daten der Patienten tabellarisch dargestellt. Der Datenerhebungsbogen ist im Anhang einzusehen.

4.3 Einzelkasuistiken

In der pädiatrischen Abteilung des SRH Waldklinikum Gera fanden sich bis April 2012 50 Patientenakten von Kindern und Jugendlichen, bei denen eine Array CGH zur genetischen Abklärung einer meist komplexen Entwicklungsverzögerung durchgeführt wurde. Der Grund der genetischen Diagnostik ist bei allen untersuchten Kindern eine Entwicklungsverzögerung, die sich in unterschiedlicher Ausprägung bei den Patienten manifestiert. Anamnestisch wurden alle klinisch relevanten Symptome erhoben und zusammen mit dem Ergebnis der Array CGH und den genetischen Datenbanken interpretiert. Die Tabelle 14 im Anhang gibt einen Überblick über alle in dieser Dissertation aufgenommenen Patienten.

Das Besondere an dem Patientengut zum damaligen Zeitpunkt der Aufarbeitung stellte zudem die Detektion einer genetischen Veränderung im X-Chromosom eines Patienten dar, welche zur Erstpublikation eines neuen Krankheitsbildes beigetragen hat. Es handelt sich dabei um das sogenannte „Lubs X-linked mental retardation syndrome“ im Zusammenhang mit verschiedenen Xq28 Duplikationen (Bartsch et al 2010).

Dies war ein Anlass für die wissenschaftliche Aufarbeitung des gesamten Patientengutes. Dabei fand sich, dass auch einige von den hier aufgezeigten Veränderungen mit Krankheitswert nur selten beschrieben wurden. Jede Beschreibung eines neuen Falls mit derartigen Veränderungen kann daher zur sichereren Unterscheidung zwischen genetischer Veränderung mit Krankheitswert und nicht pathogener Copy Number Variance (CNV) beitragen und verbessert somit entscheidend das Verständnis über die Pathogenese bestimmter Krankheitsbilder.

Im Folgenden werden drei dieser Fälle des hier beschriebenen Patientenguts vorgestellt, bei denen die Array-CGH einen positiven Befund erbrachte und einen Beitrag zur Erstbeschreibung neuer syndromaler Krankheitsbilder (Lubs-Syndrom) sowie der Erweiterung des

Ursachenspektrums bekannter Syndrome lieferte. Die zugehörigen Patientendaten finden sich in der Tabelle 14 im Anhang unter den Fallnummern 2, 3 und 5.

3.4.1 Kasuistik 1

- männlicher Patient, geboren am 28.11.2006
- Dup Xq28: minimales Ausdehnungsintervall 152,820,356-153,277,230 Mb (ca. 457 kb) (hg18)

Es handelt sich zum Zeitpunkt der Diagnosestellung um einen zwei jährigen Patienten, der eine deutliche psychomotorische Retardierung mit Verzögerung der Sprachentwicklung aufweist. Er ist nicht in der Lage frei zu sitzen, zu stehen, und kann nur eingeschränkt kommunizieren. Ebenso zeigen sich craniofaziale Dysmorphien sowie Muskeltonusstörungen im Sinne einer generalisierten Muskelhypotonie mit facialem Schwerpunkt. Der linke Fuß bildet eine vermehrte Innenrotation. Auffällig ist weiterhin ein verstärktes Speicheln bei gleichzeitig vorhandener orofazialer Schwäche. Der Patient weist kein Schmerzgedächtnis auf und ist infektanfällig, v.a. für Erkrankungen der oberen Atemwege.

Nach unauffälligem Karyogramm wurde eine MLPA durchgeführt, welche eine Duplikation des Chromosoms Xq28 nachgewiesen hat. In der Array-CGH stellt sich die Region Xq28 dar, in der eindeutig eine heterozygote Duplikation vorliegt. Die Duplikation umfasst ca. 457 kb und ca. 15 Gene, beginnend mit AVPR2 bis einschließlich EMD. Die Aberration ist eher klein (im Vergleich zu anderen Patienten mit Lubs MRXSL) und enthält u.a. die Gene MECP2 und FLNA, aber nicht L1CAM (Abbildung 7). Die Daten wurden mit Hilfe der Software Genotyping Console 3.0.1 (Fa. Affymetrix) ausgewertet, die Annotationen aus NCBI Build 36, März 2006 (hg 18) verwendet.

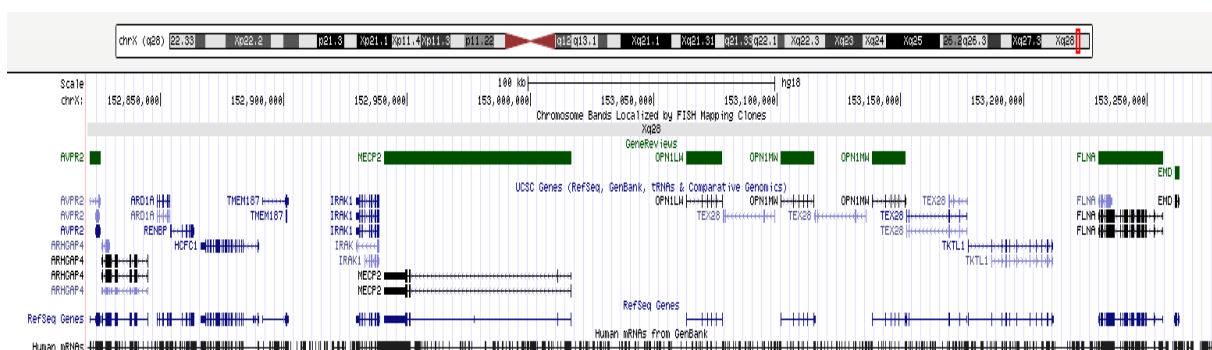


Abbildung 7: betroffenes genomisches Intervall und darin befindliche Gene bezüglich NCBI Build 36.1 vom März 2006 (hg18), UCSC Genome Browser

Die molekulargenetische familiäre Abklärung ergab beim Vater des Jungen einen unauffälligen Befund und bei der Mutter die gleiche Duplikation, allerdings liegt diese bei ihr auf dem

inaktivierten X-Chromosom sodass die Mutter klinisch unauffällig bleibt. Daraufhin wurde zudem die Großmutter mütterlicherseits untersucht, welche keinerlei pathologische Auffälligkeiten im Genom aufzeigte. Damit muss die Duplikation wahrscheinlich bei der Mutter des Jungen „de novo“ entstanden sein. Ein mögliches Keimzellmosaik kann jedoch nicht völlig ausgeschlossen werden.

Die vermutliche Ursache der klinischen Auffälligkeiten des Patienten scheint also das Lubs X-linked mental retardation syndrome, OMIM-Nummer 300260, zu sein. Der Patient zeigt ein genetisches Syndrom, welches ähnlich dem Prader Willi Syndrom primär durch eine neonatale Hypotonie auffällt und im Verlauf seinen Phänotyp ändert. Ursächlich für dieses „Hypotonie-Hypertonie-Syndrom“ liegt eine Duplikation des MeCP2-Gens und weiterer benachbarter Gene zugrunde. In vergleichbaren publizierten Fällen wurden eine im Neonatal-/Säuglingsalter vorhandene Muskelhypotonie beschrieben, welche sich im weiteren Verlauf zu einer progredienten Muskelhypertonie bis hin zur Spastik wandelten (Leuzzi et al. 2004). „Verwechslungen“ mit ICP (infantile Cerebralparese) sind deshalb möglich. Bei dem Patienten ist allerdings das L1CAM-Gen, das beim X-linked Hydrocephalus, dem MASA-Syndrom und der Spastischen Paraplegie einbezogen ist, nicht dupliziert. Daher bleibt abzuwarten, ob sich auch in seinem Fall eine Spastik entwickelt. Die Duplikation des MECP2 am langen Arm des X-Chromosoms ist durch das RETT-Syndrom näher charakterisiert. Ungefähr 80 % der Patienten mit RETT-Syndrom weisen Mutationen in diesem Gen auf (Christodoulou 2012). Es scheint wesentlich an der Entwicklung von funktionellen Leistungen des ZNS beteiligt, indem es andere Gene in den jeweiligen Entwicklungsstufen reguliert. Des Weiteren scheint dieses Gen beim "Lernen" in der Umweltauseinandersetzung eine wichtige Rolle zu spielen. In der Literatur finden sich Berichte über Jungen mit ähnlichem Befund und übereinstimmender klinischer Symptomatik wie muskulärer Hypotonie, psychomotorischen Entwicklungsstörungen und erhöhter Infektanfälligkeit (Gomot et al. 2003, Villard 2007). Die Duplikation betrifft alle Exons des MECP2-Gens, erstreckt sich mindestens bis in den Bereich des IRAK1-Gens. Die rezidivierenden Infekte des Patienten sind möglicherweise durch die Duplikation des IRAK1-Gens erklärbar, denn Kanakaraj et al. 1999 stellten fest, dass Mäuse mit IRAK1-Defizienz geringere IL-18 Immunantworten aufwiesen, gemessen an der JNK und NFkB Aktivierung. Des Weiteren stellten sie fest, dass durch die geringe IL-18 Antwort auch weniger Gamma-Interferon produziert und weniger natürliche Killerzellen zusätzlich angelockt werden.

Das EEG des Patienten vom 21.11.2008 zeigt lokale Funktionsstörungen rechts parieto-zentral. Im Schädel MRT vom 07.02.2009 wurde eine schwere Hirnreifungsstörung im Sinne einer

fehlenden Demyelinisierung mit Volumenreduktion der kortikalen Strukturen. Fronto-temporal fällt eine Erweiterung der internen und externen Liquorräume auf. Insgesamt ist dies als deutliche Entwicklungsstörung des ZNS einzustufen.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass das „Hypotonie-Hypertonie-Syndrom“ durch eine Duplikation distal am langen Arm des X-Chromosoms (Xq28) unter Einbeziehung des MeCP2-Gens verursacht wird. Die internationale Bezeichnung lautet *Lubs X-linked Mental Retardation Syndrom*. Es resultiert aus chromosomalem Rearrangement und muss in die Differentialdiagnostik der X-chromosomal erblichen mentalen Retardierung einbezogen werden. Die gefundene Duplikation kann also anhand der passenden Fallbeschreibungen in der Literatur sowie den Patientenberichten mit nahezu gleichem Aberrationsbereich aus den Datenbanken ISCA und Decipher als eindeutig krankheitsverursachend beschrieben werden.

Prognostisch muss davon ausgegangen werden, dass sich der Entwicklungsabstand des beschriebenen Patienten zu gleich alten Kindern vergrößern wird, sodass sich auch der Behinderungsgrad und der daraus resultierende Pflegeaufwand auf absehbare Zeit verstärken.

3.4.2 Kasuistik 2

- männlicher Patient, geboren am 23.08.2004
- Dup 17p13.3, minimales Ausdehnungsintervall 2,380,713 – 3,141,877 Mb (0,761164 Mb) (hg18)



Abbildung 8 a und b: Frontalfoto und Darstellung der Fingerpads

Der Patient ist zum Zeitpunkt der Diagnosestellung 5 Jahre alt und weist neben psychomotorischer und Sprachentwicklungsverzögerung ein Hyperkinetisches Syndrom sowie reduziertes Schmerzempfinden auf. Es finden sich mild ausgeprägte craniofaziale Dysmorphien und abnorme Dermatoglyphen und deutliche Fingerpads (Abbildung 8a und b). Chromosomenanalyse, FISH-Diagnostik, Subtelomerscreening und die molekulargenetische Untersuchung auf FraX-Syndrom bleiben ohne pathologischen Befund. Erst die Array-CGH

liefert die wahrscheinliche Krankheitsursache, eine heterozygote Duplikation am Chromosom 17/ dup(17) (p13.3).

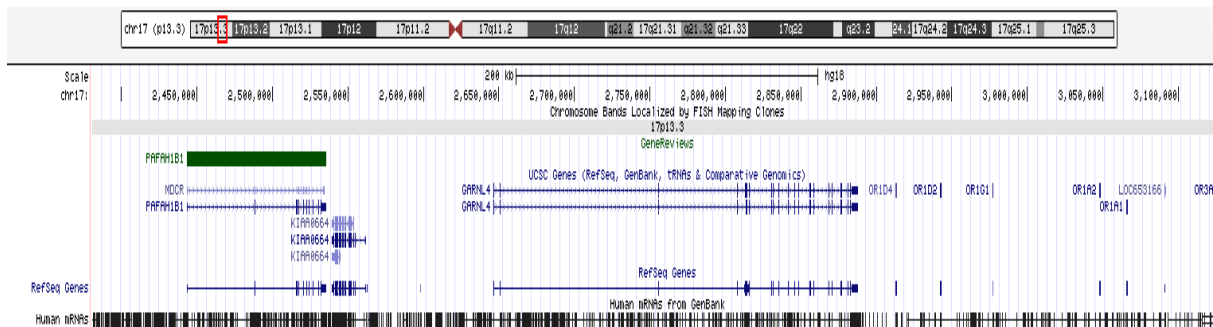


Abbildung 9: betroffenes genomisches Intervall und darin befindliche Gene bezüglich NCBI Build 36.1 vom März 2006 (hg18), UCSC Genome Browser

Die "Database of Genomic Variants" listet in dem befundeten Intervall zum Untersuchungszeitpunkt 16 bekannte Kopienzahlvariationen, welche die befundene Region aber nicht vollständig überspannen. In der "Decipher-Datenbank" werden für dieses Intervall zum Untersuchungszeitpunkt sieben Patienten mit überlappenden Duplikationen und Deletionen beschrieben, wobei bei den meisten allerdings andere Aberrationsbereiche vorliegen. Bei dem Decipher Patienten 1350 liegt eine ähnliche Duplikation des Chromosoms 17 vor (low birthweight <3 Perz., short stature, prenatal onset, prominent forehead/frontal bossing, low-set ears). In dem befundeten Intervall befindet sich das OMIM-Gen, LIS1 (PAFAH1B1), dessen Deletionen und Punktmutationen zum Miller-Dieker-Syndrom bzw. einer Lissenzephalie führen (Abbildung 9). Duplikationen führen zu einer Entwicklungsverzögerung mit mildem strukturellen Gehirnanomalien (Dysgenese des Corpus callosum, milder Volumenverlust von Cerebellum, occipitalem Cortex und Großhirn) und relativer Mikrozephalie (Bi et al. 2009). In der ISCA Datenbank finden sich zwei Patienten mit nahezu identischem Aberrationsbereich dessen Duplikation als pathologisch bewertet wird und sich phänotypisch in einer globalen Entwicklungsverzögerung sowie muskulärer Hypertonie, Lissenzephalie und Mikrozephalie äußert. Die durchgeführte Elternuntersuchung ergibt zudem bei beiden Elternteilen einen regelrechten Befund, sodass die Duplikation wahrscheinlich de novo entstanden sein muss. Damit ist die mit Hilfe der Array CGH detektierte Duplikation auf Chromosom 17 als sehr wahrscheinlich krankheitsursächlich zu bewerten.

3.4.3 Kasuistik 3

- Patient weiblich, geboren am 06.03.1996
- Del 1q43-q44: minimales Ausdehnungsintervall 241,339,271-243,557,314 Mb (2218 kb) (hg18)



Abbildung 10 a und b: Frontalfoto sowie Darstellung windend-wringender Drehbewegungen der Hände („hand-washing-movements“)

Die Patientin ist zum Zeitpunkt der Diagnosestellung 15 Jahre alt und ihr Gewicht sowie die Größe liegen unter der dritten Perzentile. Auffallend ist zudem ein Mikrocephalus. Sie weist eine ausgeprägte psychomotorische Retardierung mit Verlust der aktiven Sprache sowie craniofaziale Dysmorphien auf. Die Patientin leidet weiterhin an Epilepsie. In einer MR-Untersuchung vom 09.02.2000 zeigten sich eine Deformierung der Schädelkalotte mit Abflachung der dorsalen Region, aber keine pathologische Gyrierung und keine Ventrikelveränderungen. Die Patientin bietet wiederholt Stereotypien im Sinne windend-wringender Drehbewegungen der Hände („hand-washing-movements“) wie sie für das Rett-Syndrom typisch sind (Abbildung 10a und b). Die daraufhin erfolgte Mutationsanalyse im MECP2-Gen ergibt einen Normalbefund, ebenso wie die Methylierungsanalyse des 5-Endes des SNRPN-Gens mittels PCR-Amplifikation zum Ausschluss des Angelmann-Syndroms. Chromosomenanalyse, FISH-Diagnostik auf Mikrodeletionssyndrome, Subtelomerscreening, und MLPA-Screening auf häufige Mikrodeletionssyndrome waren ohne pathologische Befunde. Erst die Array-CGH offenbarte eine Deletion auf dem Chromosom 1.

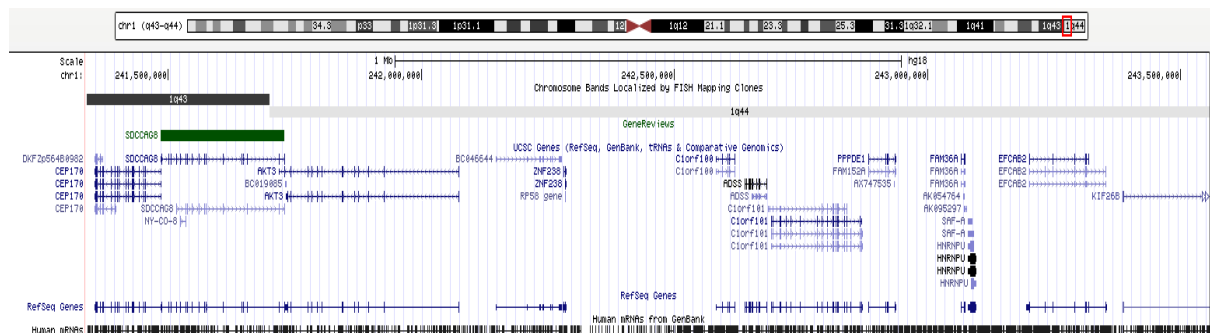


Abbildung 11: betroffenes genomisches Intervall und darin befindliche Gene bezüglich NCBI Build 36.1 vom März 2006 (hg18), UCSC Genome Browser

Es handelt sich bei der Deletion auf dem Chromosom 1 um die Region 1q43-q44 mit dem Verlust von 2218 kb und 12 involvierten Genen (CEP170-> KIF26B). In die Deletion einbezogen ist auch das Gen AKT3 (v-Akt-murine thymoma viral oncogene homolog3) (Abbildung 11), welches als Kandidatengen für Hirnfehlbildungen gilt. AKT3 reguliert das Wachstum auf eine normale Hirngröße, sowie die Entwicklung des Corpus callosum. Daher wird vermutet, dass eine Deletion in diesem Bereich zu postnataler Mikrocephalie sowie zur Agenesie des Corpus callosum führt (Boland et al 2007). Auch Ballif et al untersuchten 2012 22 Individuen mit einer 1q43q44 Deletion und Mikrocephalie, Krampfanfällen sowie Agenesie des Corpus callosum auf mögliche Kandidatengene. Dabei konnte bei fünf Patienten eine AKT3-Deletion nachgewiesen werden. Als Kandidatengen für die Agenesie des Corpus callosum vermuteten Ballif et al das Gen ZNF238- ein Transkriptions- und Chromatinregulatorgen und als kritische Region für die Krampfanfälle werden die Gene FAM36A, C1ORF199, und HNRNPU genannt. Über 90% der Patienten in dieser Studie und in der Literatur sind von Aberrationen dieser Gene betroffen, ebenso die hier beschriebene Patientin. Allerdings stellen die Autoren der Studie einen stark variierenden Phänotyp fest. Die detektierte Deletion auf Chromosom 1 gilt daher in Zusammenschau der Befunde als sehr wahrscheinlich ursächlich für das Krankheitsbild der Patientin.

4.4 Durchführung der Array-CGH

Es wurde mit einem 180k Array der Firma Agilent gearbeitet. Die Durchführung der Array-CGH der hier gelisteten Patienten fand im Labor der humangenetischen Praxis von Prof. Dr. Kohlhasse in Freiburg sowie im humangenetischen Institut der Universität Jena statt. Die Methode wurde von der Promovierenden nicht selbst durchgeführt, sondern von den entsprechenden Mitarbeitern der jeweiligen Institute. Allerdings wurden im Rahmen der Erstellung des Methodenteils dieser Dissertation die entsprechenden Arbeitsschritte vom Eingang der Patientenblutprobe bis zur Interpretation des Befundes von der Studierenden exemplarisch begleitet. Hierzu fand jeweils eine einwöchige Hospitation im Labor des

humangenetischen Instituts in Freiburg statt sowie zwei Wochen im humangenetischen Institut der Friedrich-Schiller-Universität Jena.

4.5 Auswahl geeigneter Fachliteratur

Diese Dissertation basiert vor allem auf intensiver Literaturrecherche, um die Interpretation der meist zunächst noch unklaren Array-CGH Befunde gezielt reevaluieren zu können. Genutzt wurden dafür neben den oben bereits erwähnten Datenbanken, die Online-Bibliothek Pubmed, Google Scholar sowie medizinische Fachbücher aus dem Bereich Kinderheilkunde und Humangenetik. Dabei wurden zunächst Veröffentlichungen über die Methode der Array CGH an sich bearbeitet, und schließlich der Fokus auf die Interpretation der Befunde mit Schwerpunkt auf die CNVs gelegt.

4.6 Durchführung der Interpretation der gewonnenen Ergebnisse

Nach 1,5 Jahr wurden die Befunde anhand der gängigen Datenbanken UCSC, Decipher, ISCA sowie Pubmed und diverser anderer Literatur überarbeitet, um die zuvor gewonnenen Ergebnisse zu reevaluieren. Dabei lag das oberste Augenmerk auf dem zuvor mittels Array CGH ermittelten Aberrationsbereich. Hierbei ist zu beachten, ob die Befunde mittels hg18 oder hg19 erstellt wurden, denn hieraus ergeben sich erhebliche Differenzen bezüglich der Lokalisation der entsprechenden Krankheitsgene. Zusätzlich wurden die Patientendaten des humangenetischen Instituts der Friedrich-Schiller-Universität Jena auf eventuell identische Aberrationen derer Patienten durchsucht, um eine weitere „Datenbank“ hinzuziehen zu können und die Frage nach der Pathogenität des individuellen Befundes besser beurteilen zu können. Zu diesem Zeitpunkt gab es im humangenetischen Institut der Friedrich-Schiller-Universität Jena 335 Befunde entsprechender Kinder mit mentaler Retardierung etc., welche mittels Array-CGH untersucht wurden.

Mit dem Statistikprogramm SPSS wurden für die entsprechend erhobenen Patientenmerkmale des Fragebogens Sensitivität, Spezifität, positiv und negativ prädiktive Werte, sowie die entsprechenden p-Werte berechnet. Für diesen Zweck wurde der exakte Test nach Fisher benutzt, da dieser im Gegensatz zum Chi²-Test keine bestimmte Anzahl zu untersuchender Daten voraussetzt und somit auch bei kleinerem Stichprobenumfang zuverlässige Ergebnisse liefert. Die Resultate sind im folgenden Abschnitt dargelegt.

5 Ergebnisse

Unter den 50 getesteten Kindern befinden sich 23 Jungen und 27 Mädchen. Bei 39,1 % der Jungen und 66,7 % der Mädchen lieferte die Array-CGH ein positives Ergebnis. Insgesamt war der Test bei allen untersuchten Kindern in 54 % (27 von 50) der Fälle positiv, d.h. eine genetische Aberration wurde detektiert. Von diesen 27 Patienten wurde bei 8 die Krankheitsursache (höchst-)wahrscheinlich und bei 6 Kindern eindeutig detektiert. Das heißt, bei 14 der 27 (51,9%) Patienten mit bisher ungeklärter Entwicklungsstörung und positivem Array-CGH-Befund konnte die Ursache (wahrscheinlich) aufgeklärt werden (Abbildung 12). Dies entspricht 28% (14/50) des gesamten Patientenkollektivs. Bei weiteren neun der 27 Kinder (33,3 %) konnte die gefundene Aberration als benigne Variante eingestuft werden und bei weiteren vier Patienten (14,8%) konnte kein sicherer Bezug der genetischen Anomalie zur Klinik des Kindes hergestellt werden. Die Festlegung zwischen pathologischer und benigner Aberration erfolgte durch intensive Literaturrecherche und Hinzuziehen der Einträge in Datenbanken. Des Weiteren liegt es nahe, dass eine Aberration als benigne angesehen werden kann, wenn die DNA der Eltern ebenfalls untersucht wurde und sich dort die gleiche Veränderung aufzeigte, allerdings ohne bei dem jeweiligen Elternteil phänotypische Auffälligkeiten hervorzurufen. Dennoch ist dies keine Garantie für eine eindeutige Interpretation des Befundes, wie im Kapitel 2.3 „Kopienzahlvariationen (Copy Number Variationen/CNV)“ bereits erläutert wurde.

War es nicht möglich, die Eltern in die Untersuchungen mit einzubeziehen und machten die Recherchen keine eindeutigen Aussagen bezüglich der Pathogenität der Aberration möglich, wurde die detektierte Veränderung als „unklar“ eingestuft.

Mit Hilfe des Statistikprogramms „SPSS“ wurden die Ergebnisse der Array-CGH in Bezug auf phänotypische Merkmale untersucht.

Bei 63% der Kinder mit entsprechenden craniofazialen Dysmorphien ergab die Array-CGH ein positives Ergebnis (Abbildung 13). Tabelle 4 zeigt, die Sensitivität bezogen auf dieses Merkmal liegt bei 63,2%, die Spezifität bei 75%. Das bedeutet, bei 75% der Kinder ohne CFD ist die Array-CGH tatsächlich negativ (unauffällig) ausgefallen und bei 63,2% der Kinder mit CFD kam es zu einem positiven (auffälligen) Testresultat. Der p-Wert ist hierbei $<0,05$ und damit gilt das Ergebnis als statistisch signifikant (Tabelle 5). „Auffällig“ ist in diesem Zusammenhang nicht mit „pathologisch“ gleichzusetzen, sondern beschreibt lediglich die Tatsache, dass im Genom des Patienten CNV-Imbalancen, Mikrodeletionen oder –duplikationen vorliegen, welche durchaus die Krankheitsursache darstellen können. Bei negativer Merkmalsausprägung

(fehlende CFD) ist der Test in 39,1% der Fälle negativ, dies entspricht dem negativ prädiktiven Wert (Tabelle 6). Bei positiver Merkmalsausprägung hingegen (vorhandene CFD) ist der Test in 88,9 % der Fälle positiv, was dem positiv prädiktiven Wert verkörpert. Der zugehörige p-Wert, welcher mittels exaktem Test nach Fisher errechnet wurde, lautet $p = 0,023$ (Tabelle 7). Damit gilt $p < 0,05$ und das Ergebnis ist als signifikant zu werten. Weniger aussagekräftig scheint das klinische Merkmal der Fingerpads zu sein, denn es zeigten nur 52 % der Kinder mit Fingerpads ein positives Testergebnis (Abbildung 14). Bezogen auf die Fingerpads lautet die Sensitivität nur 52% und die Spezifität 44% (Tabelle 8), der negativ prädiktive Wert 47,8% und der positiv prädiktive Wert 48,1 % (Tabelle 9). Der p-Wert in beiden Fällen ist mit $p = 1,0$ größer als 0,05 das Ergebnis damit nicht signifikant (Tabelle 10 und 11). Weiterhin statistisch nach demselben Schema untersucht wurden die Merkmale: neurologische und orthopädische Pathologien (u.a. Muskeltonusstörungen, Bewegungsstörungen, Gangstörungen, Krampfanfälle, Auftreten des KISS-Syndroms). Dabei lag der p-Wert in allen Rechnungen größer als 0,05 sodass hier kein statistischer Zusammenhang beschrieben werden kann, sondern von einem zufälligen Ergebnis ausgegangen werden muss. In Abbildung 15 und 16 wird die Häufigkeitsverteilung der neurologischen und orthopädischen Auffälligkeiten grafisch dargestellt. Die der statistischen Auswertung entsprechende Tabelle 15 findet sich im Anhang. Tabelle 12 zeigt die Häufigkeitsverteilung der verschiedenen phänotypischen Merkmalsausprägung im Patientenkollektiv bezogen auf das Testergebnis der Array-CGH. Hier wird auch noch einmal deutlich, dass die craniofazialen Dysmorphien das sensitivste Merkmal in Bezug auf einen positiven Array-CGH Untersuchungsbefund darstellen.

Unter den Aberrationen sind 22 Deletionen (61%) und 14 Duplikationen (39%) diagnostiziert wurden. 32% der Deletionen werden als eindeutig oder wahrscheinlich pathogen eingestuft, 18% als unklar und 50% als benigne. Bei den Duplikationen gelten 50% als eindeutig oder wahrscheinlich pathogen (14% davon eindeutig pathogen), 29% sind in ihrer klinischen Auswirkung unklar und 21% benigne. Tabelle 13 sowie Abbildung 17 zeigen die Verteilung der Deletionen und Duplikationen auf die einzelnen Chromosomen und machen deutlich, dass diese über das gesamte Genom verbreitet sind. Bei einigen Kindern wurden zwei Anomalien in der Array-CGH detektiert, daher die Abweichung der Gesamtzahl der Aberrationen.

Bei sieben Patienten, bei denen die detektierten Aberrationen zunächst nicht sicher mit dem Phänotyp in Verbindung gebracht werden konnten, wurden diese nach zwei Jahren, im Rahmen der Überarbeitung mit Hilfe der Datenbanken UCSC, Decipher und ISCA, als benigne Varianten eingestuft. Zwei weiteren Aberrationen zweier Patienten mit einer unklaren Bewertung des Ergebnisses der Array CGH konnten im Rahmen der Reevaluierung eine

pathognomonische Rolle zugeordnet werden. Schließlich sind lediglich vier von 50 Befunden als nicht sicher beurteilbar einzustufen. Dies entspricht einer Reduktion der unklaren Befunde von 48,1 % (13/27) auf nunmehr 14,8 %, (4 von 27) der Patienten und wird in Abbildung 18 und 19 veranschaulicht.

Die Größe der Aberrationen schwankt zwischen 0,014597 und 28,323571 Mb. Je größer die Deletion/Duplikation, umso wahrscheinlicher ist die Auswirkung auf den Phänotyp (Palmer et al 2014). Dies kann so aber nicht verallgemeinert werden, was sich auch im eigenen Patientengut widerspiegelt. Interessanterweise ist nämlich bei den hier beschriebenen Patienten die größte Aberration (Duplikation) mit 28,323571 Mb wahrscheinlich nicht pathogen und die kleinste Aberration (Deletion) mit 0,014597 Mb eindeutig pathogen.

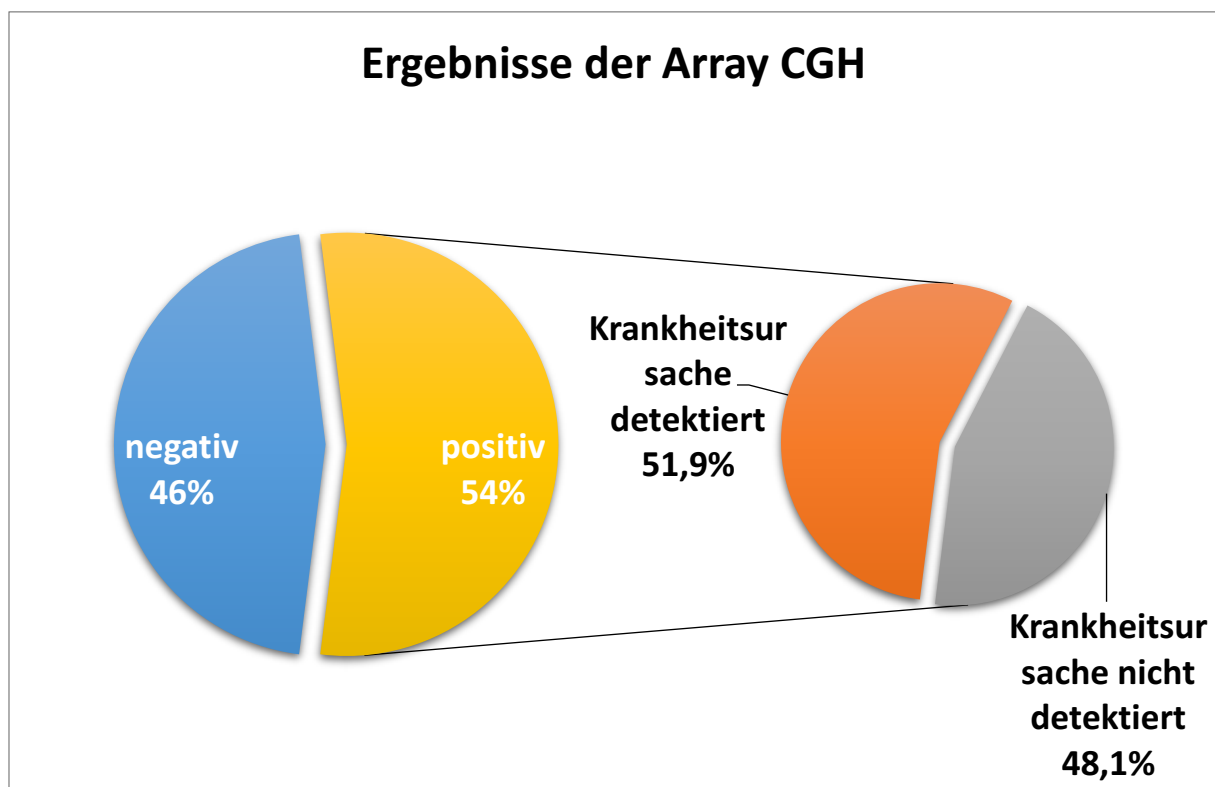


Abbildung 12: Ergebnisse der Array-CGH

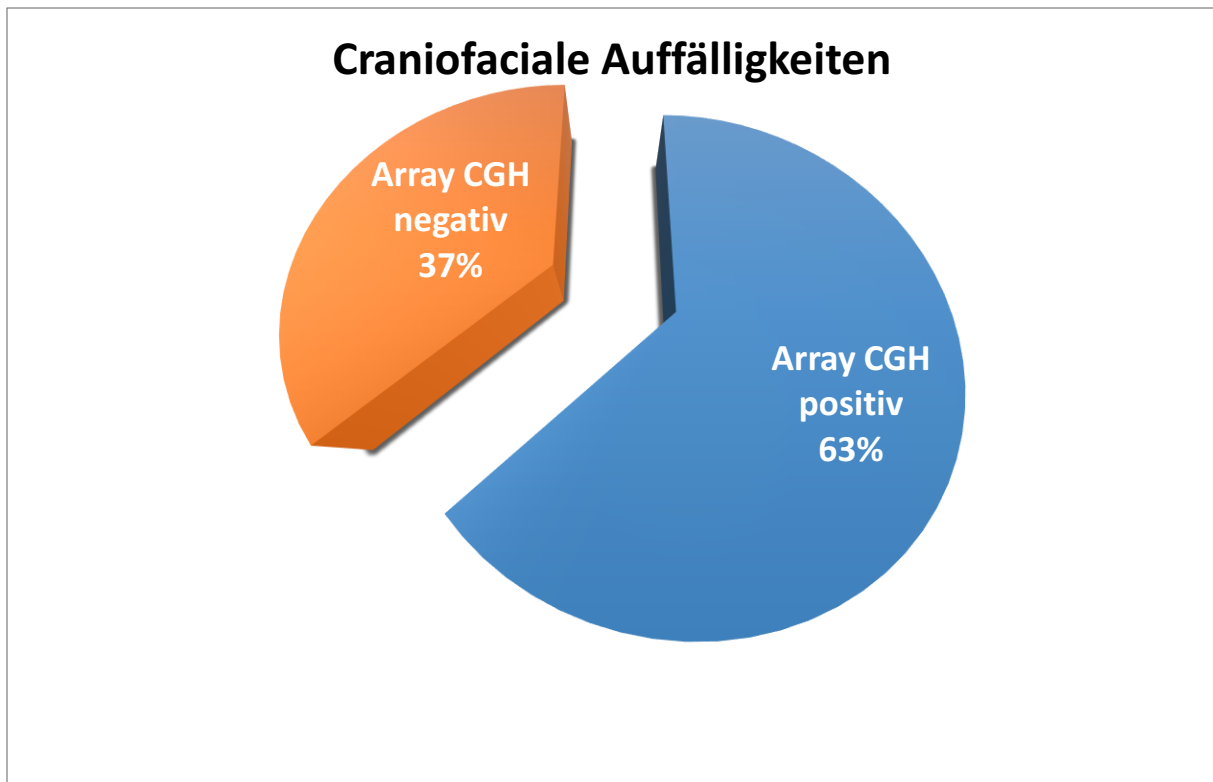


Abbildung 13: Grafik der Häufigkeit craniofaziale Auffälligkeiten

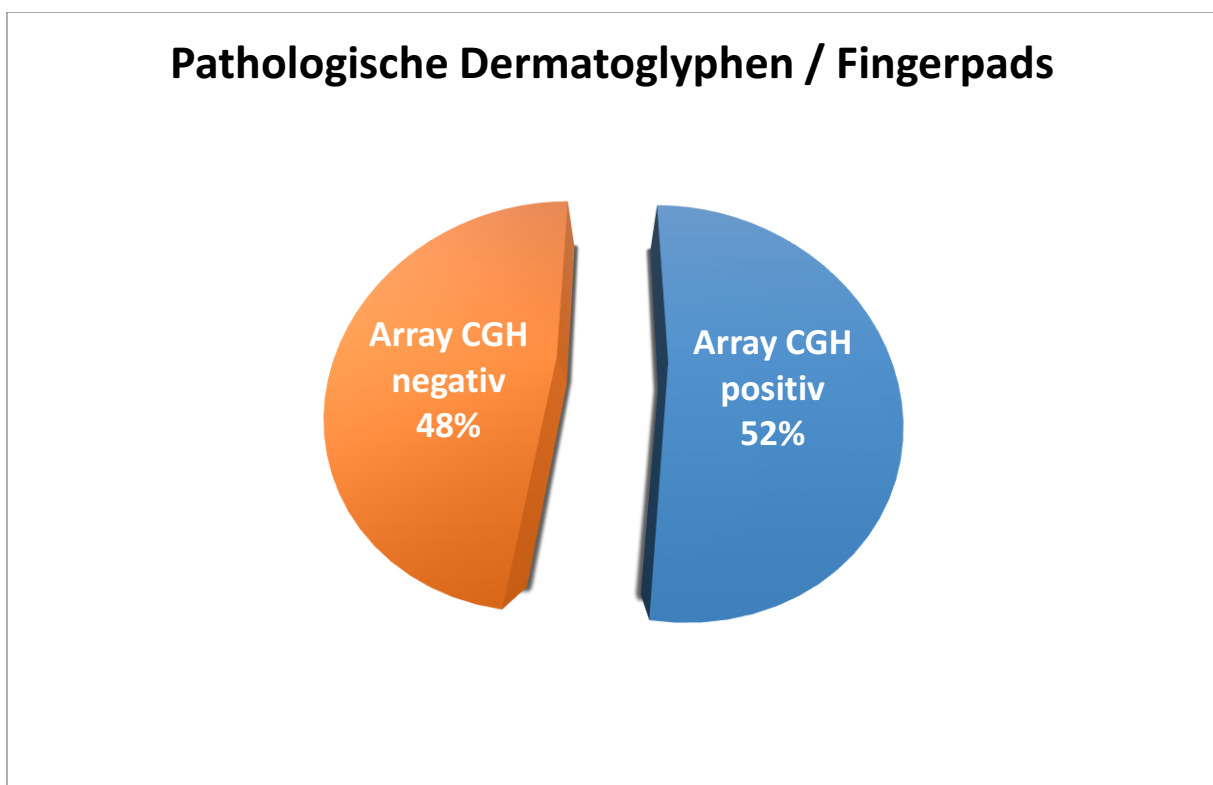


Abbildung 14: Grafik der Häufigkeit Fingerpads/Dermatoglyphen

neurologische + orthopädische Auffälligkeiten + Array CGH positiv



Abbildung 15: Grafik der Häufigkeit neurologisch-orthopädischer Auffälligkeiten insgesamt

neurologische + orthopädische Auffälligkeiten + Array CGH positiv

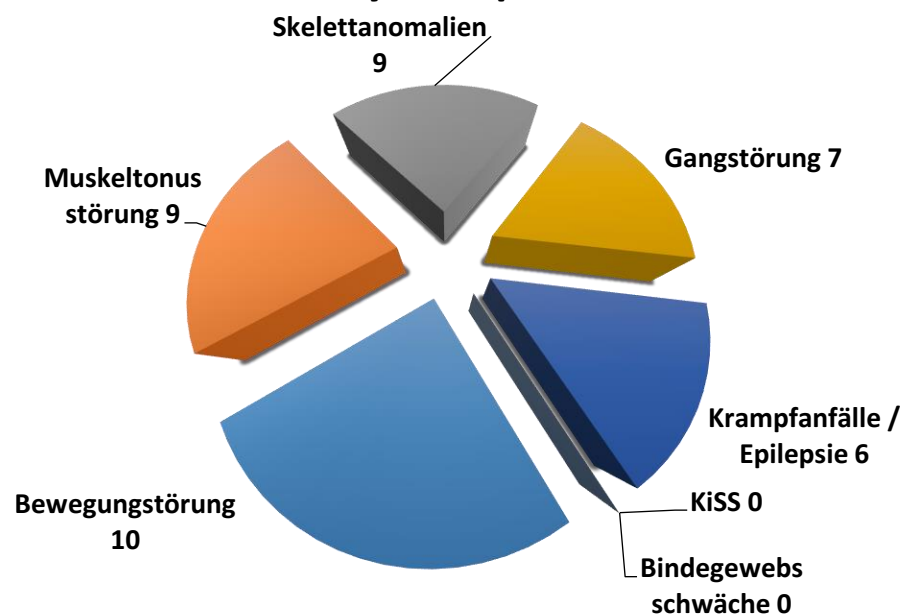


Abbildung 16: Grafik der Häufigkeit neurologisch-orthopädischer Auffälligkeiten aufgeschlüsselt

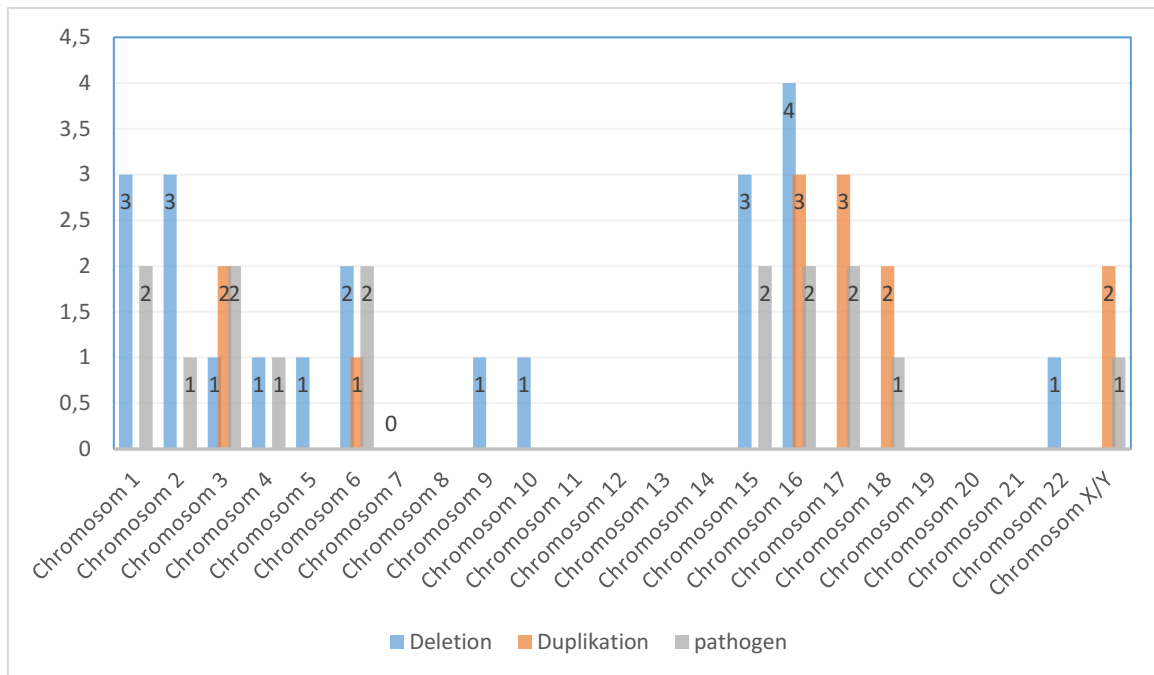


Abbildung 17: Häufigkeit der Deletionen und Duplikationen auf den einzelnen Chromosomen

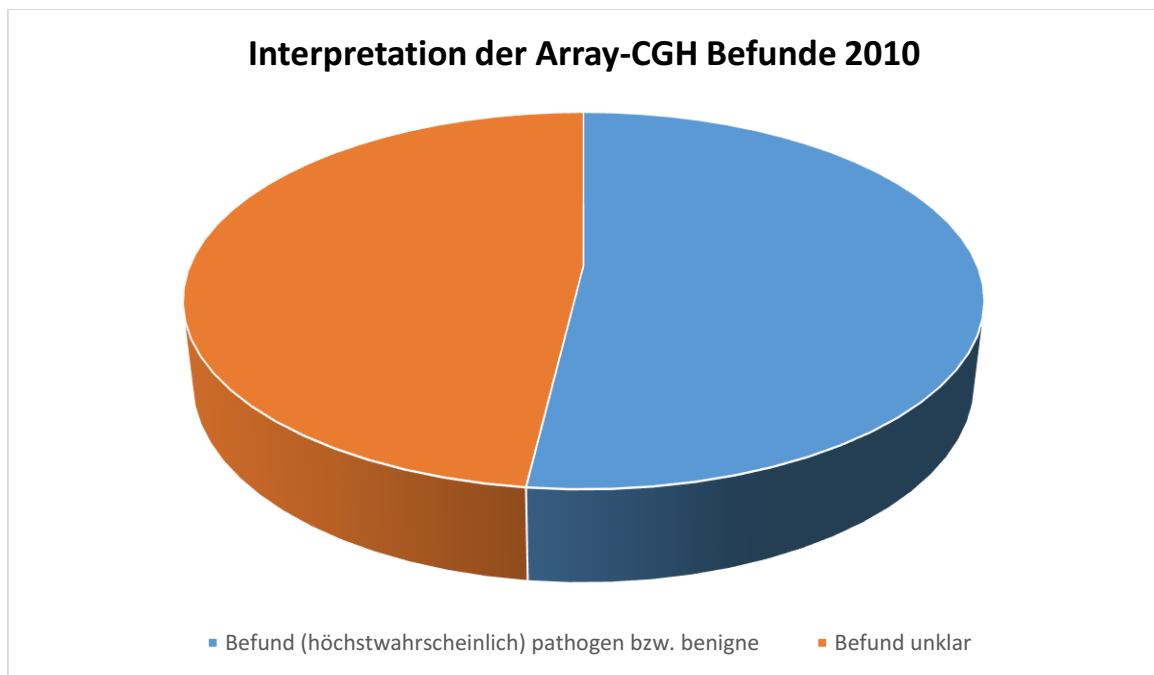


Abbildung 18: Interpretation der Array-CGH Befunde 2010

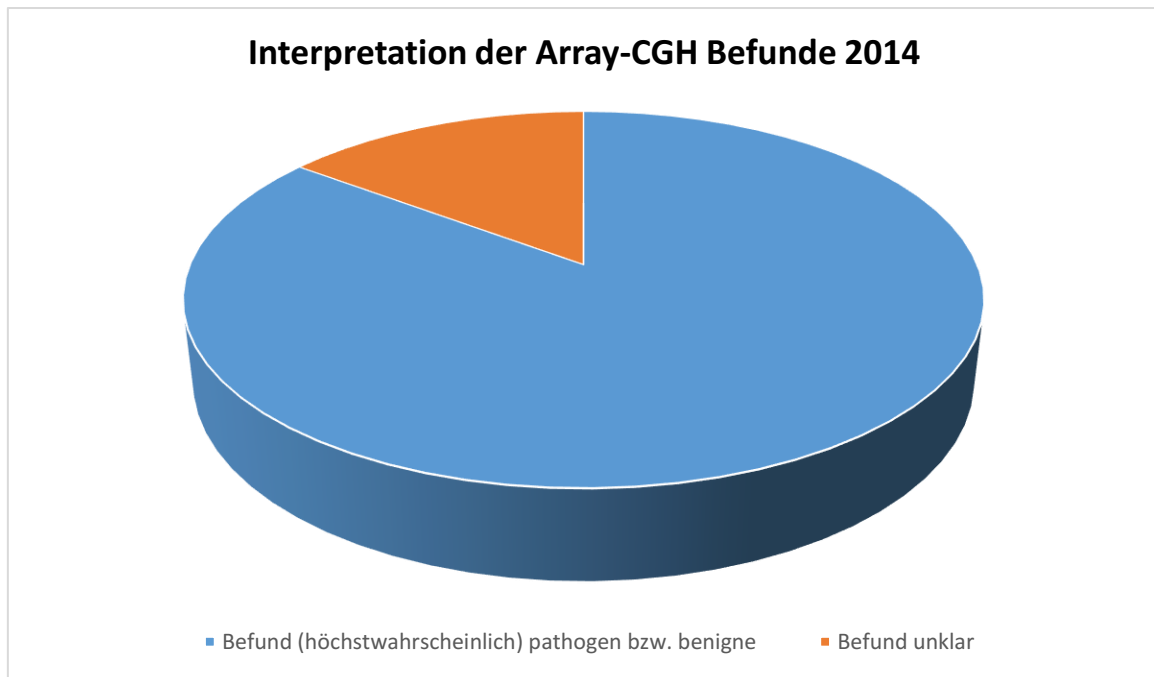


Abbildung 19: Interpretation der Array-CGH Befunde 2014

Tabelle 4: Spezifität und Sensitivität craniofaziale Dysmorphien Kreuztabelle

Array-CGH positiv * Craniofaciale Auffälligkeiten Kreuztabelle

			Craniofaciale Auffälligkeiten		Gesamt
			0	1	
Array-CGH positiv	0	Anzahl	9	14	23
		% innerhalb von Craniofaciale Auffälligkeiten	75,0%	36,8%	46,0%
	1	Anzahl	3	24	27
		% innerhalb von Craniofaciale Auffälligkeiten	25,0%	63,2%	54,0%
Gesamt		Anzahl	12	38	50
		% innerhalb von Craniofaciale Auffälligkeiten	100,0%	100,0%	100,0%

Tabelle 5: Chi-Quadrat-Test/exakter Test nach Fisher CFD

Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (1-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	5,346 ^a	1	0,021	0,044	0,023
Kontinuitätskorrektur ^b	3,920	1	0,048		
Likelihood-Quotient	5,482	1	0,019		
Exakter Test nach Fisher					
Zusammenhang linear-mit-linear	5,239	1	0,022		
Anzahl der gültigen Fälle	50				

a. 0 Zellen (,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 5,52.

b. Wird nur für eine 2x2-Tabelle berechnet

Tabelle 6: Positiv und Negativ Prädiktive Werte CFD

Kreuztabelle

			Craniofaciale Auffälligkeiten		Gesamt
			0	1	
Array-CGH positiv	0	Anzahl	9	14	23
		% innerhalb von Array-CGH positiv	39,1%	60,9%	100,0%
	1	Anzahl	3	24	27
		% innerhalb von Array-CGH positiv	11,1%	88,9%	100,0%
Gesamt		Anzahl	12	38	50
		% innerhalb von Array-CGH positiv	24,0%	76,0%	100,0%

Tabelle 7: Chi-Quadrat-Test/exakter Test nach Fisher Prädiktive Werte CFD

Chi-Quadrat-Tests					
	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (1-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	5,346 ^a	1	0,021	0,044	0,023
Kontinuitätskorrektur ^b	3,920	1	0,048		
Likelihood-Quotient	5,482	1	0,019		
Exakter Test nach Fisher					
Zusammenhang linear-mit-linear	5,239	1	0,022		
Anzahl der gültigen Fälle	50				

a. 0 Zellen (,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 5,52.

b. Wird nur für eine 2x2-Tabelle berechnet

Tabelle 8: Spezifität und Sensitivität Fingerpads Kreuztabelle

Array-CGH positiv * Fingerpads Kreuztabelle					
			Fingerpads		Gesamt
			0	1	
Array-CGH positiv	0	Anzahl	11	12	23
		% innerhalb von Fingerpads	44,0%	48,0%	46,0%
	1	Anzahl	14	13	27
		% innerhalb von Fingerpads	56,0%	52,0%	54,0%
Gesamt	Anzahl		25	25	50
	% innerhalb von Fingerpads		100,0%	100,0%	100,0%

Tabelle 9: Positiv und Negativ Prädiktive Werte Fingerpads

Kreuztabelle					
			Fingerpads		Gesamt
			0	1	
Array-CGH positiv	0	Anzahl	11	12	23
		% innerhalb von Array-CGH positiv	47,8%	52,2%	100,0%
	1	Anzahl	14	13	27
		% innerhalb von Array-CGH positiv	51,9%	48,1%	100,0%
Gesamt	Anzahl		25	25	50
	% innerhalb von Array-CGH positiv		50,0%	50,0%	100,0%

Tabelle 10: Chi-Quadrat-Test/exakter Test nach Fisher Fingerpads

Chi-Quadrat-Tests					
	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2- seitig)	Exakte Signifikanz (2- seitig)	Exakte Signifikanz (1- seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	0,081 ^a	1	0,777	1,000	0,500
Kontinuitätskorrektur ^b	0,000	1	1,000		
Likelihood-Quotient	0,081	1	0,777		
Exakter Test nach Fisher					
Zusammenhang linear-mit-linear	0,079	1	0,779		
Anzahl der gültigen Fälle	50				

a. 0 Zellen (,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 11,50.

b. Wird nur für eine 2x2-Tabelle berechnet

Tabelle 11: Chi-Quadrat-Test/exakter Test nach Fisher Prädiktive Werte Fingerpads

Chi-Quadrat-Tests					
	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2- seitig)	Exakte Signifikanz (2- seitig)	Exakte Signifikanz (1- seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	0,081 ^a	1	0,777	1,000	0,500
Kontinuitätskorrektur ^b	0,000	1	1,000		
Likelihood-Quotient	0,081	1	0,777		
Exakter Test nach Fisher					
Zusammenhang linear-mit-linear	0,079	1	0,779		
Anzahl der gültigen Fälle	50				

a. 0 Zellen (,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 11,50.

b. Wird nur für eine 2x2-Tabelle berechnet

Tabelle 12: Häufigkeitsverteilung der verschiedenen phänotypischen Merkmalsausprägung

	Patienten mit positivem Array- CGH Befund		Patienten mit negativem Array- CGH Befund	
Wachstumsverzögerung	4/27	14,8 %	5/23	21,7 %
Entwicklungsverzögerung	26/27	96,3 %	23/23	100 %
CFD (z.B. Augen, Nase, Ohren, Form)	24/27	88,8 %	14/23	60,9 %
pathologische Fingerpads, Dermatoglyphen	13/27	48,1 %	12/23	56,5 %
Haut-/Haarauffälligkeiten	4/27	14,8 %	3/23	13 %
neurologische/orthopädische Auffälligkeiten	19/27	70,3 %	14/23	60,9 %
Verhaltensauffälligkeiten	14/27	51,6 %	11/23	47,8 %
pathologische bildgebende Verfahren (MRT, EEG)	10/27	37 %	5/23	21,7 %

Tabelle 13: Übersicht Deletionen/Duplikationen und Krankheitswert am eigenen Patientengut

	Deletionen	Duplikationen
eindeutig pathogen	del 1p36 (Fall-Nr.: 31) del 1q43q44 (Fall-Nr.: 5) del 3p26.1 (Fall-Nr.: 6) del 15q25.1q25.2 (Fall-Nr. 9)	- dup 6p22.3p25.3 (Fall-Nr: 25) - dup 17p12 (Fall-Nr: 28)
wahrscheinlich pathogen	del 2q13q13 (Fall-Nr: 7) del 15q13.3 (Fall-Nr.: 1) del 16p11.2p11.2 (Fall-Nr.: 4)	dup16p12.3p13.11(Fall-Nr.: 41) dup 17p13.1 (Fall-Nr.: 8) dup17p13.3 (Fall-Nr: 3) dup18p11.21 (Fall-Nr.: 33) dup Xq28 (Fall-Nr.: 2)
Unklar	del 4p16.1-p15.33 del 15q11.2 del 16q23.3q24.1 del 16p12.3p13.11	dup 3p22.3p26.1 dup 3q33q24 dup 14q32.11 dup 16q23.1
Benigne	del 1q25.3 del 2p23.1 del 2q33.2 del 5q12.2q12.3 del 6q22.1 del 6q24.2 del 9q33.2q33.3 del 10q26.13q26.13 del 16p12 del 20p12.1 del 22q11.23q11.23	dup16q22.1q22.1 dup 18q23 dup Xp22.33

6 Diskussion

6.1 Evaluierung der Array-CGH

Die Array-CGH wird zunehmend bei Personen mit Lernbehinderungen (Intelligenzminderung) und angeborenen Anomalien eingesetzt. Diesbezüglich werden in der Metaanalyse von Sagoo et al. vom März 2009 19 Studien und damit die Daten von insgesamt 13926 Patienten ausgewertet. Der Artikel bewertet die diagnostische und falsch-positive Aussagekraft der Methode. Die Auswahl der Patienten umfasst Menschen mit mentaler Retardierung und kongenitalen Anomalien, bei denen konventionelle zytogenetische Analysen negative Ergebnisse, also Normalbefunde, lieferten. Die Einschlusskriterien sind demnach vergleichbar mit dem Patientenkollektiv der hier vorliegenden Arbeit. Die gesamte diagnostische Ausbeute der kausalen Anomalien mittels Array-CGH ergab 10 % (95% Konfidenzintervall 8-10%). Die „Number needed to test“ um eine ursächliche Anomalie zu identifizieren wurde mit 10 (95% KI: 8-13%) angegeben.

Einige weitere Studien haben sich zum Ziel gemacht, die diagnostischen Möglichkeiten der Array CGH zu bewerten. De Vries et al haben 100 Menschen mit ungeklärter mentaler Retardierung via Array CGH untersucht, nachdem bei Ihnen eine normale GTG-Bänderung der Chromosomen und keine pathologischen Befunde mittels MLPA erhoben werden konnten. Bei 10 % der Studienteilnehmer wurden mit Hilfe eines Mikroarrays, welcher 32.447 BACS beinhaltet, klinisch relevante de novo Aberrationen gefunden. Dieser Wert deckt sich mit der diagnostischen Ausbeute der Metaanalyse von Sagoo et al. Die Autoren schlussfolgerten, dass die diagnostische Aussagekraft der Array CGH mindestens zweimal so hoch ist wie die der Standard GTG-Karyotypisierung. Dennoch sollte nicht unerwähnt bleiben, dass bei 97 % der Patienten Kopienzahlvariationen detektiert wurden. Die Mehrzahl dieser Aberrationen wurde von phänotypisch unauffälligen Elternteilen vererbt. Eine große Anzahl der derzeit als normal zu bewertenden Kopienzahlvariationen finden sich in zahlreichen Individuen. Daher ist die Befundinterpretation solcher Gesamtgenom-Arrays schwierig. Es würde sich sehr beschwerlich und teuer gestalten, von 97 % der Patienten einen oder beide Elternteile mit zu testen. Dies wäre einerseits für das genetische Labor eine zusätzliche Last, andererseits wird unnötige Angst bei Patienten und deren Eltern erzeugt. Daher wird der Gesamtgenom-Array vornehmlich in der Forschung eingesetzt, wohingegen für die Untersuchung von Patienten mit spezifisch vermuteten Chromosomenaberrationen besser zielgerichtete Arrays eingesetzt werden. Solche Arrays werden speziell entworfen, um unbalancierte Aberrationen der subtelomeren Regionen und anderer klinisch signifikanter Regionen aufzudecken. Die zu testende chromosomale Region wird sorgfältig nach der klinischen Eindeutigkeit und phänotypischen Merkmalen

ausgewählt. Andererseits haben die Studien über bestimmte CNVs und den dazugehörigen Phänotyp es ermöglicht, einen Zusammenhang zwischen diesen beiden herzustellen und somit die Beurteilung der CNVs erleichtert.

Bassem A. Bejjani und Lisa G. Shaffer berichten in ihrem Review von 1500 Patienten, bei dem ein auf spezielle Genloci gerichteter Array zum Einsatz kam. Der verwendete Array bestand aus 832 BACs und repräsentierte nur 140 Genloci. Dabei war er auf genetische Regionen mit bekannter klinischer Relevanz gerichtet. Dieser detektierte bei 9 % der Patienten eine genetische Anomalie, 2,4 % wiesen Polymorphismen oder familiäre Varianten auf, 0,9 % zeigten eine Aberration mit derzeit unklarer klinischer Relevanz und bei 5,6 % wurde eine klinisch signifikante genomische Aberration gefunden. Dabei eingeschlossen sind Deletionen im Subtelomer-Bereich, unbalancierte Aberrationen, Mikrodeletionen, seltene Anomalien, und low-level Trisomie Mosaik. Die Studie soll keine exakte Erfassung von Individuen mit speziellen Selektionskriterien darstellen, sondern die Realität der klinisch genetischen Praxis widerspiegeln. Deshalb liefern diese Ergebnisse eine gute Schätzung der zytogenetischen Aberrationen, die mit einem speziellen Mikroarray im diagnostischen Alltag identifiziert werden können. Die Ergebnisse von Bejjani und Shaffer zeigen ebenso, dass die Analyse via Mikroarray nahezu doppelt so hoch ist, wie die der konventionellen zytogenetischen Verfahren.

6.2 Etablierung der Array CGH zur Diagnostik der Intelligenzminderung

Eine Intelligenzminderung/-störung ist eine bedeutende Einschränkung der kognitiven Fähigkeiten, die sich bereits vor dem 18. Lebensjahr manifestiert. Weltweit sind 1-3 % der Individuen betroffen, wovon schätzungsweise in ungefähr der Hälfte der schweren Fälle die genetischen Faktoren eine kausale Rolle spielen und in ca. 15 % bei Patienten mit milder Lernbehinderung (Coutton et al 2015). Als intelligenzgemindert werden Personen mit einem Intelligenzquotienten (IQ) < 70 eingeordnet, wobei milde Formen (IQ 70 bis 50, Prävalenz circa 1,5 %) häufiger sind als mittelschwere und schwere Formen (IQ < 50). Die Prävalenz liegt hier bei 0,4 % (Tzschach und Ropers 2007). Intelligenzminderung zeichnet sich durch eingeschränkte kognitive, sprachliche und soziale Fähigkeiten aus. Sie äußert sich mitunter schon im Säuglingsalter (muskuläre Hypotonie, schlechter Blickkontakt, verminderte motorische Aktivität) und in der frühen Kindheit, zum Beispiel durch abnormes Spielverhalten und verzögertes Erreichen der Entwicklungsstufen (Tzschach und Ropers 2007).

Die klinische Beurteilung von Kindern mit Intelligenzminderung umfasst typischerweise die Einschätzung durch einen Pädiater gefolgt von diversen biochemischen und hämatologischen Tests sowie chromosomalen und molekulargenetischen Testverfahren. Derzeitige zytogenetische Analysen beinhalten eine Karyotypbestimmung ebenso wie Fluoreszenz-in-

situ-Hybridisation (FISH) oder Multiplex Ligation dependent Probe Amplifikation, die beide submikroskopische chromosomale Deletionen und sogar einzelne, auf bestimmten Chromosomen lokalisierte Gendelektionen nachweisen können. Wenn nun diese eben genannten Verfahren ausschließlich negative Ergebnisse liefern, wird zunehmend routinemäßig die Array-CGH bei diesen Patienten mit Lernbehinderung eingesetzt, denn sie identifiziert „Copy-Number Variationen“ über das gesamte Genom bei einer gleichzeitig hohen Auflösung. Es besteht die Möglichkeit einige tausend individuelle DNA-Sequenzen zu benutzen und innerhalb eines einzigen Experiments genaue Informationen über die Lokalisation von jeder detektierten Aberration zu erhalten. Es ist deutlich geworden, dass die Array CGH zahlreiche Vorteile gegenüber bisherigen konventionellen zytogenetischen Methoden hat, wie beispielsweise die Möglichkeit eine schnelle und genom-weite Beurteilung bei hoher Auflösung (< 1Mb) vorzunehmen und zeitgleich präzise Informationen über den Genlocus zu erhalten (Sagoo et al. 2009).

Wie bereits erwähnt sind die „**Copy Number Varianten**“ oftmals schwierig im Hinblick auf ihre pathogene Relevanz zu beurteilen. Die klinische Bedeutung dieser Kopienzahlvariationen wird gewöhnlich durch Vergleich des Phänotyps des Patienten mit bisher beschriebenen Phänotypen mit ähnlichen Aberrationen aus Datenbanken oder innerhalb der patienteneigenen Familie beurteilt oder aber die Anomalie umfasst eine solche Größe, dass es sehr unwahrscheinlich ist, dass sie phänotypisch ohne Konsequenz bleibt. Die Varianten werden als benigne beschrieben, wenn ein phänotypisch gesunder Mensch dieselbe Aberration trägt, wobei man hier sichergehen muss, dass sich die Bruchpunkte der Mutation im Genom des Patienten und z.B. des Elternteils nicht unterscheiden, da dies hohe klinische Relevanz haben kann.

Es besteht allerdings nach wie vor keine Pflicht der Institutionen, welche die Array-CGH in Forschung und Klinik einsetzen, die phäno- und genotypischen Patientendaten in die jeweiligen Datenbanken einzutragen. Dies und der Fakt, dass die vorhandenen Informationen zu einzelnen phänotypischen Merkmalen oftmals nur unzureichend aufgeführt sind, erschwert dem Untersucher maßgeblich die Interpretation und Befundung der gewonnenen Ergebnisse.

Sagoo et al. berichteten bereits 2007 über die Array CGH als Routine Test-Diagnostik und kamen damals zu dem Schluss, dass es für diese Methode keine ausreichende Evidenz gibt, um sie tatsächlich als weiteres Instrument neben den bisher existierenden zytogenetischen Verfahren einzusetzen, obwohl sie in gewissen Umständen hilfreich sein kann. Der steigende klinische Gebrauch sowie die Veröffentlichung weiterer Array-CGH basierender Studien gab der Gruppe um Sagoo den Anstoß, die damals veröffentlichten Ergebnisse anzufechten. In die 2009 folgende Metaanalyse wurden Studien einbezogen, welche die Array CGH nutzten, um

genetische Aberrationen in Patienten mit mentaler Retardierung und kongenitalen Anomalien zu identifizieren, bei denen die üblichen zytogenetischen Verfahren negativ ausfielen. Die diagnostische Aussagekraft wird für jede Studie definiert als die Zahl der Patienten, bei denen mittels Array-CGH die krankheitsverursachenden Variationen entdeckt wird, dividiert durch die Gesamtanzahl der getesteten Individuen. Jener Prozentsatz, der sich aus der Anzahl der Patienten ergibt, bei denen eine nicht ursächliche oder aber derzeit nicht beurteilbare Aberration detektiert wird, geteilt durch die Gesamtzahl der getesteten Menschen wird als Falsch-Positive Rate angesehen.

Die 2009 veröffentlichte Metaanalyse umfasst im Vergleich zu dem 2007 erschienenen Artikel mehr Studien und ermöglichte es damit dem Forschungsteam die Heterogenität zu testen. Dabei ergibt sich eine starke Evidenz für Heterogenität ($I^2 = 72\%$). Dies erklären die Autoren durch die unterschiedlichen Probandenanzahlen sowie den Gebrauch unterschiedlicher Arrays, die sich in der Auflösung unterscheiden. Dabei ergibt sich für Arrays mit einer Auflösung von weniger als 1 Mb mit 14 % eine größere diagnostische Aussagekraft. Die Beziehung zwischen Fallzahl und Aussagekraft (größere Aussagekraft in kleineren Studien) lässt sich durch mehrere Ansätze erklären. So ist es beispielsweise möglich, dass die größeren Studien auch vermehrt Patienten mit milderer ausgeprägter mentaler Retardierung einschließen, die dann seltener eine kausale Aberration aufweisen. Auch denkbar ist eine mögliche statistische Verzerrung durch Publikationsbias, also die bevorzugte Veröffentlichung von Studien mit signifikanten Resultaten. Dennoch erscheint das Spektrum der getesteten Patienten gleich: alle Studien wählten Patienten mit Lernbehinderung und angeborenen Anomalien und alle diese Menschen hatten in der Untersuchung unauffällige Ergebnisse. Innerhalb der 19 betrachteten Studien stammt nur eine aus der asiatischen Bevölkerung, sodass keine Aussagen über ethnische Unterschiede oder Gemeinsamkeiten getroffen werden können. Daher liefert diese Metaanalyse ausschließlich direkte Evidenz für streng selektierte, hauptsächlich westliche (Nord- und Südamerika) Patienten, die mit Hilfe anderer Tests nicht diagnostiziert werden konnten, sodass die Array CGH zum Einsatz kam.

Die am häufigsten in der Literatur beschriebenen identifizierten genetischen Regionen beinhalten 1p36, 15q11-q12, und 22q11.2 (Sagoo et al 2009). Der Grund für derartige genetische „hot spots“ im menschlichen Genom liegt zum einen darin, dass sich diese Bereiche durch segmentale Duplikationen auszeichnen (UCSC Genome Browser on Human) und somit eine starke Prädisposition für ungleiche Paarung während der Meiose vorliegt (Siegenthaler et al. 2006). Zum anderen befinden sich in diesen Regionen sogenannte „fragile Stellen“ bzw. „fragile sites“ und daher Bereiche in Metaphase-Chromosomen mit erhöhter Brüchigkeit

aufgrund repetitiver DNA-Sequenzen (Mrasek et al. 2010, Murken et al. 2011). Mit diesem Wissen könnte man in Zukunft zielgerichteter Arrays designen, um eine exaktere Abschätzung von Größe und Merkmalen diverser Aberrationen genau zu identifizieren. Die Ergebnisse der Metaanalyse sprechen für den Einsatz der Array CGH als Routine- Diagnostikinstrument zur Detektion mentaler Retardierung und kongenitalen Anomalien. Trotzdem kamen die Autoren zu dem Schluss, dass der Einsatz der Array CGH als „First-Line“ Methode der genetischen Diagnostik bei kognitiven Einschränkungen besser noch durch weitere größere prospektive Studien beurteilt werden sollte.

Der Einsatz der Array CGH als Teil der Diagnostik kindlicher mentaler Retardierung wird zunehmen, wenn die Kosten für diese Technik sinken. Doch aufgrund der ebenso erhobenen Falsch-Positiven Rate gehört die Array CGH in die Hände eines klinischen Genetikers, der in der Lage ist die Testresultate mit der nötigen Expertise sowie Vorsicht zu interpretieren und den Eltern nahe zu bringen.

6.3 Gegenwärtiger Stellenwert der Array-CGH und zukünftige Ausblicke

Die Array CGH hat zudem zahlreiche Anwendungen in der Forschung, wie z.B. in der Onkologie und die damit verbundene Beschreibung neuer Krankheitsgene. Für die Betrachtung der Array CGH als diagnostisches Instrument sollte man den Blickwinkel etwas verändern, denn klinische Fälle sollten nicht wie Forschungsprojekte behandelt werden. Idealerweise sollten derartige Arrays so konstruiert sein, dass die diagnostische Ausbeute maximal ist, gleichzeitig aber die Rate des falsch positiven Ergebnisses minimal ist. Mit Array CGH detektierte chromosomale Aberrationen können mittels FISH bestätigt werden. Als Alternative zur Array CGH könnten auch multiple FISH Untersuchungen dienen, allerdings wäre dies mit enormen Kosten und Aufwand verbunden. Deswegen kommt die Array CGH, mit der Möglichkeit, die meisten unbalancierten mikroskopischen und submikroskopischen Anomalien zu identifizieren, auch in der zytogenetischen Diagnostik zum Einsatz.

Obwohl die Array-Technik einen Meilenstein für die genetische Forschung sowie Diagnostik darstellt, drängt sich bereits eine neue Technik in den Vordergrund: die Hochdurchsatzsequenzierung, welche auch unter dem Begriff „Next Generation Sequencing“, NGS, bekannt ist. Hiermit kann zum einen das gesamte Genom innerhalb weniger Wochen sequenziert werden oder aber durch Anreicherungsverfahren beispielsweise alle Exons für eine Person oder ein Gen für viele Personen gleichzeitig analysiert werden (Rauch 2012). Zielmechanismus der Sequenzierung ist die Ermittlung vieler kurzer DNA-Motive, die anschließend vom Computer wie ein Puzzle durch überlappende Abschnitte zusammengesetzt werden (Murken 2011). Dies wird realisiert durch eine massive parallele Sequenzierung von

Millionen DNA-Fragmenten in einem einzigen Sequenzierungsablauf. Hierdurch wird eine gesteigerter Sequenzierleistung erreicht, welche in der Lage ist, die genetischen Grundlagen vieler Krankheitsbilder, vor allem solcher mit ausgeprägter genetischer Heterogenität, umfassend zu analysieren (Xu 2015). Die Methode bietet sich an für Erkrankungen, welche durch Mutationen großer oder zahlreicher verschiedener Gene ausgelöst werden z.B. für familiären Brust- und Eierstockkrebs, Retinitis pigmentosa oder Fanconi-Anämie (Hackmann et al. 2012). Es werden alle Gene (Genpanels) sequenziert, die der jeweiligen Krankheit zugrunde liegen, nachdem man diese Abschnitte aus dem Gesamt-Genom angereichert hat (Sequence Capture). NGS spielt zudem eine große Rolle bei der Entdeckung neuer Krankheitsgene und wird somit die Humangenetik zunehmend beeinflussen (Rauch 2012). Weiterhin gibt es Ansätze mittels „Next-Generation-Sequencing“ auf Kopienzahlvariationen rückzuschließen. Dies wird in Zukunft auch der Standard für die Bestimmung von CNVs werden (Girirajan und Eichler 2010). In dem hier vorgestellten Patientengut wurde bei einem Patienten zusätzlich ein NGS durchgeführt, dessen Befund in der Array-CGH keinen eindeutig kausalen Befund erbrachte (Tabelle 14 im Anhang: Fall-Nummer 15). Dabei wurde eine X-chromosomale Mutation im OPHN1-Gen entdeckt, welche mit Dysmorphien sowie Kleinhirnhypoplasien assoziiert ist. OPHN1-Mutationen wurden zunächst als nicht-syndromale X-Chromosom abhängige Intelligenzdefizite (XLID) beschrieben. Die Untersuchung einiger Patienten mit dieser Mutation mittels bildgebenden Verfahren des Gehirns zeigte einen deutlichen Zusammenhang mit dem Auftreten von frontotemporaler Atrophie sowie cerebraler Hypoplasie (Santos-Rebouças 2014 et al). Tzschach et al beschrieben 2015 ebenfalls dieses neue Krankheitsbild, indem 107 XLID-Gene mittels NGS untersucht wurden aus einer Kohorte, bestehend aus insgesamt 150 männlichen intelligenzgeminderten, entwicklungsverzögerten Patienten. Auch bei dem Patienten des hier aufgearbeiteten Kollektivs konnte mittels MRT-Untersuchung des Schädels eine Kleinhirnhypoplasie links nachgewiesen werden und somit die X-chromosomale Mutation im OPHN1-Gen im Nachhinein als wahrscheinlich pathogen eingestuft werden.

Allerdings wirft auch das „Next-Generation-Sequencing“ Fragen auf. Die Auswertung derartig großer Datenmengen verlangt nach Computersystemen, die eine enorme Leistung hinsichtlich Speicherkapazität und Software verrichten müssen. Diese technischen Entwicklungen sollten dann aber möglichst auch von Nichtinformatikern bedient werden können. Doch natürlich ist dies nur ein kleiner Schritt in der Analyse der geballten genetischen Information. Die eigentliche Herausforderung wird es sein, der Masse an Datenmaterial einen „Sinn“ zu geben.

Dabei werden zahlreiche neue Fragen aufkommen, die es alle zu beantworten gilt, um die Daten korrekt zu interpretieren.

Damit steht fest, dass das menschliche Genom wohl noch auf unbestimmte Zeit Gegenstand intensivster Forschung sein wird, um auch in der Diagnostik eine effiziente Weiterentwicklung zu verzeichnen und letztendlich revolutionäre Therapien einzuleiten. Somit ist und bleibt die Array – CGH ein wichtiger Bestandteil in der genetischen Diagnostik mentaler Retardierungssyndrome.

6.4 Diskussion der Ergebnisse des eigenen Patientenkollektivs

Die Array-CGH detektierte im gesamten Patientengut in 28% (14 von 50) der Fälle pathologische CNVs. Diese positive Detektionsrate von 28% übersteigt die Angaben, welche in der aktuellen Literatur zu lesen sind. Diese liegen im Durchschnitt zwischen 10% und 20%. Beim Suchen nach Lösungen für diesen Wert fällt natürlich zuerst die relativ kleine Patientenkollektivzahl mit 50 Kindern auf. Bei einem solch teuren Testverfahren müssen die Indikationen allerdings streng gestellt werden, sodass zum Zeitpunkt der Fallzahlerhebung nur die entsprechende Anzahl klinisch sehr „verdächtiger“ Kinder getestet wurde. Um die Anzahl der Patienten zu steigern, hätte man noch andere genetische Institute, Kinderkliniken und diverse Praxen anschreiben und in die Datenerhebung mit einbeziehen können. Diese Dissertation beschreibt hingegen den Stellenwert der Array-CGH in *einem* Krankenhaus der Maximalversorgung. Ausschlaggebend hierbei ist, dass die Patienten sich dort „unselektiert“ vorstellen und demnach der Frage nach der Rolle und dem Stellenwert einer solch präzisen genetischen Methode im klinischen Alltag besser nachgegangen werden kann. Zudem gibt es keinen einheitlichen Standard in der Erfassung der Patientendaten unter den Instituten und es werden unterschiedliche genetische Labore angefragt. Optimaler Weise sollten alle Patienten mit einem auffälligen Array-CGH Befund in solche Datenbanken standardisiert und ausführlich aufgenommen werden, um die klinisch-genetische Befundung zu erleichtern bzw. in einigen Fällen erst zu ermöglichen. Bisher herrscht allerdings keine Pflicht für die entsprechenden Institute die Patientendaten in solche Datenbanken einzutragen. Eine höhere statistische Aussagekraft hätte man außerdem erzielen können, wenn man neben der Fallgruppe auch noch eine gesunde Kontrollgruppe getestet hätte. Damit wäre es möglich eine vergleichende Angabe über Sensitivität und Spezifität des genetischen Tests zu treffen. Allerdings ist es ethisch nicht vertretbar, Eltern phänotypisch gesunder Kinder mit eventuell detektierten genomischen Aberrationen zu konfrontieren. Dies könnte ungeahnte Einschnitte in das Leben der Betroffenen bedeuten, sodass es, auch aus Kostengründen, nicht in Frage kam, eine Kontrollgruppe anzulegen. Eine virtuelle Kontrollgruppe im weitesten Sinne stellen die zahlreichen Patienten

der Datenbanken dar, welche sich allerdings nicht quantifizieren lassen, sondern lediglich als Referenz zur Interpretation der eigens gewonnenen Ergebnisse dienen.

Wenn man sich allerdings differenzierter betrachtet, wie die 28 % positive Detektionsrate zu Stande kommen, stellt der Leser fest, dass nicht nur eindeutig pathogene chromosomale Aberrationen in das Ergebnis eingerechnet wurden, sondern auch die höchstwahrscheinlich krankheitsverursachenden. Nach abgeschlossener Literaturrecherche sowie Überarbeitung mit Hilfe der Datenbanken ISCA, Decipher und UCSC lässt sich bei sechs der 50 Patienten ein *eindeutig* kausaler Zusammenhang zwischen gefundener Aberration und klinischem Phänotyp nachweisen. Dies entspricht 12 % des Patientenkollektivs und stimmt daher mit den in der Literatur beschriebenen 10-20 % überein. Auch die Tatsache, dass bestimmte phänotypische Merkmale die „Trefferquote“ auf pathologische CNVs erhöhen, wie im hier beschriebenen Patientenkollektiv die craniofazialen Dysmorphien, deckt sich mit der aktuellen Literatur. So beschreiben Shoukier et al. in ihrer Studie von 2012 die höchste diagnostische Ausbeute in Patienten mit Mikrocephalie, Kleinwuchs, angeborenen Herzfehler sowie Gedeih-/Entwicklungsstörung.

7 Schlussfolgerung

Unter den 50 getesteten Kindern konnte bei 12 % ein eindeutig kausaler Zusammenhang zwischen detektierter Aberration und Phänotyp nachgewiesen werden. Dies deckt sich demnach mit den in der Literatur angegebenen 10-20 %. Bei weiteren 16 % wurde eine krankheitsverursachende Aberration wahrscheinlich nachgewiesen. Dies bedeutet, dass selbst unter intensivsten Recherchen nicht immer eindeutig von der Mutation auf das Krankheitsbild geschlossen werden kann und es die Rolle des Arztes ist entsprechend verantwortungsvoll und rational mit dem Ergebnis umzugehen. Die Verwendung der Array-CGH stellt daher eine einzigartige Chance in der Diagnostik dar, zur ätiologischen Klärung genetischer Befunde beizutragen. Bei allen Möglichkeiten der Array-CGH-Technik sollte man nicht vergessen, dass hier der Übergang von der Forschung in die Diagnostik erst seit einem Jahrzehnt erfolgt. So klärt die Array-CGH nicht nur offene Fragen, die Interpretation der Befunde kann auch neue Fragen aufwerfen. Durch Array-CGH-Studien ist entdeckt worden, dass das menschliche Genom einen unerwartet hohen Anteil von Bereichen enthält, deren Kopienzahl bei phänotypisch normalen Menschen variiert. Die Größe dieser CNVs reicht von einigen Kilobasen bis zu mehreren Megabasen. Es wird geschätzt, dass jedes Individuum mindestens 3-11 solcher Variationen. Datenbanken, die solche Polymorphismen (d.h. Mutationen, die sich nicht offensichtlich auf den Phänotyp auswirken) auflisten, werden erstellt und sind noch unvollständig. Wenn in der DNA eines Patienten durch die Array-CGH Aberrationen gefunden werden, ist es oft spekulativ, ob diese überhaupt für den Phänotyp verantwortlich sind. In den meisten Fällen ist es nötig, ebenfalls die elterliche DNA zu untersuchen, um zu unterscheiden, ob es sich um krankheitsverursachende Veränderungen oder benigne CNVs handelt. Die Wahrscheinlichkeit, dass eine chromosomale Aberration krankheitsverursachend ist, steigt mit der Größe der Aberration, wenn sie de novo vorliegt, wenn sie in keiner Datenbank für Polymorphismen vorliegt, wenn Gene betroffen sind, die mit dem beobachteten Phänotyp in Verbindung gebracht werden können, wenn Fälle mit gleicher (ähnlicher) Aberration bekannt sind und ähnlichen Phänotyp zeigen, wenn es sich um eine Deletion handelt (Mohrmann 2013). Das heißt, ein Abgleich der in der Array-CGH nachgewiesenen Veränderungen mit genetischen Patientendatenbanken ist unverzichtbar. Finden sich Patienten mit den gleichen oder ähnlichen Veränderungen im Genomabschnitt, ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass es sich um eine pathogene Veränderung handelt. Insbesondere dann, wenn sich Überschneidungen im klinischen Merkmalsspektrum finden.

Je mehr die Array-CGH in der klinischen Diagnostik eingesetzt wird, desto mehr wird sich auch das Array Design an die Ansprüche dieses Bereichs anpassen. Hierfür zeigt die

vorliegende Arbeit einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Merkmalsausprägung der craniofazialen Dysmorphien und dem Aufdecken der Diagnose via Array CGH. Unter Beachtung bestimmter phänotypischer Merkmalsausprägungen kann der Kliniker den Einsatz der Array CGH zielgerichteter verwenden und die diagnostische Ausbeute der Methode entscheidend erhöhen. Diese Vorselektion der Patienten spart sowohl den Betroffenen als auch dem Untersucher wertvolle Zeit und dem Gesundheitswesen Geld. Eine wichtige Voraussetzung für die schnelle und zielgerichtete Diagnosestellung mittels Array-CGH stellt, wie bereits erwähnt, die Verwendung der Datenbanken dar. Daher ist es von herausragender Bedeutung, dass die Kliniker, welche die Array CGH als diagnostisches Instrument gebrauchen, die Datenbanken mit den entsprechenden Daten ihrer Patienten vervollständigen und schließlich mehr und mehr CNVs erfasst werden und phänotypisch zugeordnet werden können. Die gerade ab 01.07.2016 zur genetischen Diagnostik durch die Kassenärztliche Vereinigung zugelassenen modernsten molekulargenetischen Untersuchungsmethoden, wie das Next Generation Sequencing, einschließlich der krankheitsgruppen-spezifischen Gen-Panel-Diagnostik, werden den Anteil des Nachweises kausaler genetischer Veränderungen bei bisher ungeklärten Fällen weiter erhöhen (Kassenärztliche Bundesvereinigung 2016).

Die genetische Aufarbeitung jedes Patientenguts kann einen entscheidenden Beitrag zur Beschreibung neuer Krankheitsbilder liefern. Zur letztendlichen Diagnosestellung ist dabei oftmals ein Zusammenspiel mehrerer genetischer Verfahren notwendig. Es ist deutlich geworden, dass dies auch ein langwieriger, zeitaufwändiger Prozess sein kann, da zunehmend mehr und mehr krankheitsrelevante Mutationen erkannt werden sowie benigne Kopienzahlvariationen beschrieben werden. Umso bedeutender ist daher die genaue Befunddokumentation der Patienten in den dafür eingerichteten Datenbanken. Jeder Beitrag liefert somit ein weiteres Puzzlestück für die Erschließung des menschlichen Genoms.

8 Literaturverzeichnis

- Asadollahi R, Oneda B, Joset P, Azzarello-Burri S, Bartholdi D, Steindl K, Vincent M, Cobilanschi J, Sticht H, Baldinger R, Reissmann R, Sudholt I, Thiel CT, Ekici AB, Reis A, Bijlsma EK, Andrieux J, Dieux A, FitzPatrick D, Ritter S, Baumer A, Latal B, Plecko B, Jenni OG, Rauch A. 2014. The clinical significance of small copy number variants in neurodevelopmental disorders. *J Med Genet.* 51(10):677-88
- Ballif BC, Rosenfeld JA, Traylor R, Theisen A, Bader PI, Ladda RL, Sell SL, Steinraths M, Surti U, McGuire M, Williams S, Farrell SA, Filiano J, Schnur RE, Coffey LB, Tervo RC, Stroud T, Marble M, Netzloff M, Hanson K, Aylsworth AS, Bamforth JS, Babu D, Niyazov DM, Ravnan JB, Schultz RA, Lamb AN, Torchia BS, Bejjani BA, Shaffer LG. 2012. High-resolution array CGH defines critical regions and candidate genes for microcephaly, abnormalities of the corpus callosum, and seizure phenotypes in patients with microdeletions of 1q43q44. *Hum Genet.* 131(1):145-56
- Bartnik M, Nowakowska B, Derwiń K, Wiśniowiecka-Kowalnik B, Kędzior M, Bernaciak J, Ziemkiewicz K, Gambin T, Sykulski M, Bezniakow N, Korniszewski L, Kutkowska-Kamierczak A, Kłapecki J, Szczka K, Shaw C, Mazurczak T, Gambin A, Obersztyn E, Bocian E, Stankiewicz P. 2013. Application of array comparative genomic hybridization in 256 patients with developmental delay or intellectual disability. *Human Genetics*, 55(1):125–144
- Bartsch O, Gebauer K, Lechno S, van Esch H, Froyen G, Bonin M, Seidel J, Thamm-Mücke B, Horn D, Klopocki E, Hertzberg C, Zechner U, Haaf T. 2010. Four unrelated patients with Lubs X-linked mental retardation syndrome and different Xq28 duplications. *Am J Med Genet A*, 152A (2):305-12
- Bejjani B, Shaffer L, Saleki R, Ballif B, Rorem E, Sundin K, Theisen A, Kashork C. 2005. Use of targeted array-based CGH for the clinical diagnosis of chromosomal imbalance: Is less more?, *American Journal of Medical Genetics*, 134(3):259-67
- Bergmann I. 2011. *Patentverletzungen in der Biotechnologie*, Wiesbaden: Springer Verlag, 54-70
- Bi W, Sapir T, Shchelochkov OA, Zhang F, Withers MA, Hunter JV, Levy T, Shinder V, Peiffer DA, Gunderson KL. 2009. Increased LIS1 expression affects human and mouse brain development. *Nat. Genet.* 41:168-17

Boland E, Clayton-Smith J, Woo VG, McKee S, Manson FD, Medne L, Zackai E, Swanson EA, Fitzpatrick D, Millen KJ, Sherr EH, Dobyns WB, Black GC. 2007. Mapping of deletion and translocation breakpoints in 1q44 implicates the serine/threonine kinase AKT3 in postnatal microcephaly and agenesis of the corpus callosum. *Am J Hum Genet.* 81(2):292-303

Cheung S, Shaw C, Yu W, Li J, Ou Z, Patel A, Yatsenko S, Cooper M, Furman P, Stankiewicz P, Lupski P, Chinault A, Beaudet A. 2005. Development and validation of a CGH microarray for clinical cytogenetic diagnosis. *Genetics in Medicine,* 7:422–432

Christodoulou J. 2012. MECP2-Related Disorders. GeneReviews® [Internet], <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1497> (Stand: 25.07.2016)

Cook E, Scherer S. 2008. Copy-number variations associated with neuropsychiatric conditions. *Nature* 455:919-923

Cooper GM, Coe BP, Girirajan S, Rosenfeld JA, Vu TH, Baker C, Williams C, Stalker H, Hamid R, Hannig V, Abdel-Hamid H, Bader P, McCracken E, Niyazov D, Leppig K, Thiese H, Hummel M, Alexander N, Gorski J, Kussmann J, Shashi V, Johnson K, Rehder C, Ballif BC, Shaffer LG, Eichler EE. 2011. A copy number variation morbidity map of developmental delay. *Nat Genet.* 43(9):838-46

Coutton C, Dieterich K, Satre V, Vieville G, Amblard F, David M, Cans C, Jouk P, Devillard F. 2015. Array-CGH in children with mild intellectual disability: a population-based study. *European Journal of Pediatrics.* 174 (1):75-83

Conrad DF, Pinto D, Redon R, Feuk L, Gokcumen O, Zhang Y, Aerts J, Andrews TD, Barnes C, Campbell P, Fitzgerald T, Hu M, Ihm CH, Kristiansson K, Macarthur DG, Macdonald JR, Onyiah I, Pang AW, Robson S, Stirrups K, Valsesia A, Walter K, Wei J; Wellcome Trust Case Control Consortium, Tyler-Smith C, Carter NP, Lee C, Scherer SW, Hurles ME. 2010. Origins and functional impact of copy number variation in the human genome. *Nature,* 464(7289):704-12

de Vries BB, Pfundt R, Leisink M, Koolen DA, Vissers LE, Janssen IM, Reijmersdal S, Nillesen WM, Huys EH, Leeuw N, Smeets D, Sistermans EA, Feuth T, van Ravenswaaij-Arts CM, van Kessel AG, Schoenmakers EF, Brunner HG, Veltman JA. 2005. Diagnostic genome profiling in mental retardation. *Am J Hum Genet.* 77:606–616

Evangelidou P, Alexandrou A, Moutafi M, Ioannides M, Antoniou P, Koumbaris G, Kallikas I, Velissariou V, Sismani C, Patsalis PC. 2013. Implementation of high resolution whole

genome array CGH in the prenatal clinical setting: advantages, challenges, and review of the literature. *Biomed Res Int*. 346762

Freeman JL, Perry GH, Feuk L, Redon R, McCarroll S, Altshuler D, Aburatani H, Jones K, Tyler-Smith C, Hurles M, Carter N, Scherer S, Lee C. 2007. Copy number variation: New insights in genome diversity. *Genome Research*, 16(8):949-959

Fuhrmann C. 2008. Entwicklung der Array-CGH zur hochauflösenden, genomweiten Untersuchung von DNA-Veränderungen einzelner Tumorzellen [Dissertation]. München: Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität

Gillessen-Kaesbach G, Siebert R. 2012. Stellenwert der Array-basierten molekularen Karyotypisierung. *Medizinische Genetik*, 24(2):84

Girirajan S, Eichler E. 2010. Phenotypic variability and genetic susceptibility to genomic disorders. *Hum Mol Genet*. 19(R2): R176–R187

Girirajan S, Rosenfeld JA, Coe BP, Parikh S, Friedman N, Goldstein A, Filipink RA, McConnell JS, Angle B, Meschino WS, Nezarati MM, Asamoah A, Jackson KE, Gowans GC, Martin JA, Carmany EP, Stockton DW, Schnur RE, Penney LS, Martin DM, Raskin S, Leppig K, Thiese H, Smith R, Aberg E, Niyazov DM, Escobar LF, El-Khechen D, Johnson KD, Lebel RR, Siefkas K, Ball S, Shur N, McGuire M, Brasington CK, Spence JE, Martin LS, Clericuzio C, Ballif BC, Shaffer LG, Eichler EE. 2012. Phenotypic heterogeneity of genomic disorders and rare copy-number variants. *N Engl J Med*, 367(14):1321-31

Gomot M, Gendrot C, Verloes A, Raynaud M, David A, Yntema HG, Dessay S, Kalscheuer V, Frints S, Couvert P, Briault S, Blesson S, Toutain A, Chelly J, Desportes V, Moraine C. 2003. *Am J Med Genet*, 123A(2):129-39

Hackmann K, Engels H, Schröck E. 2012. Molekulare Karyotypisierung in der genetischen Diagnostik. *Medizinische Genetik*, 24(2):93

Hirsch-Kauffmann, M, Schweiger M, Schweiger M. 2009. Biologie und molekulare Medizin für Mediziner und Naturwissenschaftler. Siebte Auflage. Stuttgart: Thieme-Verlag, Seite 180

Hochstenbach R, Buizer-Voskamp JE, Vorstman JA, Ophoff RA. 2011. Genome arrays for the detection of copy number variations in idiopathic mental retardation, idiopathic generalized epilepsy and neuropsychiatric disorders: lessons for diagnostic workflow and research. *Cytogenet Genome Res* 135:174–202

Iafrate AJ, Feuk L, Rivera MN, Listewnik ML, Donahoe PK, Qi Y, Scherer SW, Lee C. 2004. Detection of large-scale variation in the human genome. *Nat. Genet.* 36:949–951

ICD 10, International Classification of Diseases, www.icd-code.de (Stand 15.07.2013)

Itsara A, Cooper G, Baker C, Girirajan S, Li J, Absher D, Krauss R, Myers R, Ridker P, Chasman D, Mefford H, Ying P, Nickerson D, Eichler E. 2009. Population Analysis of Large Copy Number Variants and Hotspots of Human Genetic Disease [Review]. *American Journal of Human Genetics*, 84(2):148-61

Kanakaraj, P., Ngo, K., Wu, Y., Angulo, A., Ghazal, P., Harris, C.A., Siekierka, J. J., Peterson, P. A., Fung-Leung, W. P. 1999. Defective interleukin (IL)-18-mediated natural killer and T helper cell type 1 responses in IL-1 receptor-associated kinase (IRAK)-deficient mice. *J. Exp. Med.* 189:1129-1138

Kassenärztliche Bundesvereinigung. 2015. Geistige Entwicklungsstörung ungeklärter Ätiologie - Analyse auf Mikrodeletion und Mikroduplikation. Einheitlicher Bewertungsmaßstab (EBM), 257

Kassenärztliche Bundesvereinigung. 2016. Weiterentwicklung der humangenetischen Gebührenordnungspositionen zum 1. Juli. Einheitlicher Bewertungsmaßstab (EBM), Kapitel 11

Kohlhase J. Indikationskriterien für Array CGH (EBM Ziffer 11500): http://www.humangenetik-freiburg.de/mediapool/43/433039/data/KriterienCGH_EBM.pdf (Stand: 17.07.2016)

Lee C, Iafrate AJ, Brothman AR. 2007. Copy number variations and clinical cytogenetic diagnosis of constitutional disorders. *Nat Genet.* 39(7):48-54

Leuzzi V, Di Sabato ML, Zollino M, Montanaro ML, Seri S. 2004. Early-onset encephalopathy and cortical myoclonus in a boy with MECP2 gene mutation. *Neurology*, 63(10):1968-70.

Miller DT, Adam MP, Aradhya S. 2010. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am J Hum Genet*, 86:749–764

Mohrmann I. 2013. Array-CGH bei Patienten mit Intelligenzminderung. [Dissertation]. Lübeck: Universität zu Lübeck

- Mrasek K, Schoder C, Teichmann A, Behr K, Franze B, Wilhelm K, Blaurock N, Claussen U, Liehr T, Weise A. 2010. Global screening and extended nomenclature for 230 aphidicolin-inducible fragile sites, including 61 yet unreported ones, *Int J Oncol*, 36(4):929-940
- Murken J, Grimm T, Hollinski-Feder E, Zerres K. 2011. Taschenatlas Humangenetik. Achte Auflage. Stuttgart: Thieme Verlag, 160-232
- Noterdaeme M. und Enders A. 2008. Autistische Störungen und Intelligenzminderung. Zertifizierte Fortbildung pädiatrische Praxis. Seite 42, http://www.adhs-info-zentrum.de/dokV2/741/CME_Noterdaeme_pp72_1.pdf (Stand: 17.07.2016)
- Palmer E, Speirs H, Taylor PJ, Mullan G, Turner G, Einfeld S, Tonge B, Mowat D. 2014. Changing interpretation of chromosomal microarray over time in a community cohort with intellectual disability. *Am J Med Genet A*, 164A(2):377-85
- Pinkel D, Segraves R, Sudar D, Clark S, Poole I, Kowbel D, Collins C, Kuo WL, Chen C, Zhai Y, Dairkee SH, Ljung BM, Gray JW, Albertson DG. 1998. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays [Abstract]. In: *Nat Genet*. 20:207-211
- Preiksaitiene E, Molytė A, Kasnauskiene J, Ciuladaite Z, Utkus A, Philippos C, Kučinskas P. 2014. Considering specific clinical features as evidence of pathogenic copy number variants. *J Appl Genet*. 55(2):189-96
- Rauch A, Hoyer J, Guth S, Zweier C, Kraus C, Becker C, Zenker M, Hüffmeier U, Thiel C, Rüschenhoff F, Nürnberg P, Reis A, Trautmann U. 2006. Diagnostic yield of various genetic approaches in patients with unexplained developmental delay or mental retardation. *Am J Med Genet A*. 140(19):2063-74
- Rauch A. 2008. Molekulare Karyotypisierung in der klinischen Diagnostik. *medizinische genetik*. 20:386-394
- Rauch A. 2012. Next-Generation -Sequenzierung, Ein Quantensprung in der Aufklärung genetischer Erkrankungen. *Medizinische Genetik* 12(3): 44-46
- Rauch A, Oneda B. 2012. Molekulare Karyotypisierung in der Diagnostik neurokognitiver Entwicklungsstörungen. *Medizinische Genetik*, 24(2): 97
- Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L, Perry GH, Andrews TD, Fiegler H, Shapero MH, Carson AR, Chen W, Cho EK, Dallaire S, Freeman JL, González JR, Gratacòs M, Huang J,

Kalaitzopoulos D, Komura D, MacDonald JR, Marshall CR, Mei R, Montgomery L, Nishimura K, Okamura K, Shen F, Somerville MJ, Tchinda J, Valsesia A, Woodwark C, Yang F, Zhang J, Zerjal T, Zhang J, Armengol L, Conrad DF, Estivill X, Tyler-Smith C, Carter NP, Aburatani H, Lee C, Jones KW, Scherer SW, Hurles ME. 2006. Global variation in copy number in the human genome. *Nature*, 444(7118):444-54

Rost I. 2000. *Monatsschrift Kinderheilkunde* 148:55

Sagoo G, Burton H, Wright C. 2007. Array-CGH for the diagnosis of learning disability. Foundation for Genomics and Population Health, Cambridge

Sagoo G, Butterworth A, Sanderson S, Shaw-Smith C, Higgins J, Burton H. 2009. Array CGH in patients with learning disability (mental retardation) and congenital anomalies: updated systematic review and meta-analysis of 19 studies and 13,926 subjects. *Genet Med*. 11(3):139-46.

Santos-Rebouças CB, Belet S, Guedes de Almeida L, Ribeiro MG, Medina-Acosta E, Bahia PR, Alves da Silva AF, Lima dos Santos F, Borges de Lacerda GC, Pimentel MM, Froyen G. 2014. [Abstract]. A novel in-frame deletion affecting the BAR domain of OPHN1 in a family with intellectual disability and hippocampal alterations. *Eur J Hum Genet*. May;22(5):644-51

Sebat J, Lakshmi B, Troge J, Alexander J, Young J, Lundin P, Maner S, Massa H, Walker M, Chi M. 2004. Large-scale copy number polymorphism in the human genome. *Science* 305:525–528

Shaffer LG, Kashork CD, Saleki R, Rorem E, Sundin K, Ballif BC, Bejjani BA. 2006. Targeted genomic microarray analysis for identification of chromosome abnormalities in 1500 consecutive clinical cases. *J Pediatr* 149(1): 98–102

Shoukier M, Klein N, Auber B, Wickert J, Schröder J, Zoll B, Burfeind P, Bartels I, Alsat EA, Lingen M, Grzmil P, Schulze S, Keyser J, Weise D, Borchers M, Hobbiebrunken E, Röbl M, Gärtner J, Brockmann K, Zirn B. 2012. Array CGH in patients with developmental delay or intellectual disability: are there phenotypic clues to pathogenic copy number variants? *Clin Genet*: 83:53–65

Siegenthaler W, Blum H. 2006. *Klinische Pathophysiologie*, 2006, Neunte Auflage. Stuttgart: Thieme, 5

- Simoni M, Wieacker P: Zytogenetische und molekulargenetische Untersuchungen. 2009. [Abstract] In: Andrologie-Grundlagen und Klinik der reproduktiven Gesundheit des Mannes. Dritte Auflage. Heidelberg: Springer Medizin Verlag, 126-128
- Sireteanu A, Covic M, Gorduza EV. 2012. Array CGH: technical considerations and applications. Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi, 116(2):545-51
- Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S, Nickolenko J, Benner A, Döhner H, Cremer T, Lichter P. 1997. Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. Genes Chromosomes Cancer [Abstract], 399-407
- Speer C, Gahr M. 2001. Pädiatrie. Zweite Auflage. Heidelberg: Springer Verlag 2001, 37
- Turner DJ, Miretti M, Rajan D, Fiegler H, Carter NP, Blayney ML, Beck S, Hurles ME. 2008. Germline rates of de novo meiotic deletions and duplications causing several genomic disorders. Nat Genet. 40(1):90-5
- Tzschach A, Ropers H. 2007 Deutsches Ärzteblatt. Genetik der mentalen Retardierung. 104 (20)
- Tzschach A, Grasshoff U, Beck-Woedl S, Dufke C, Bauer C, Kehrer M, Evers C, Moog U, Oehl-Jaschkowitz B, Di Donato N, Maiwald R, Jung C, Kuechler A, Schulz S, Meinecke P, Spranger S, Kohlhase J, Seidel J, Reif S, Rieger M, Riess A, Sturm M, Bickmann J, Schroeder C, Dufke A, Riess O, Bauer P. 2015. [Abstract]. Next-generation sequencing in X-linked intellectual disability. Eur J Hum Genet. 23(11):1513-8
- UCSC Genome Browser. University of California Santa Cruz. <https://genome.ucsc.edu> (Stand: 25.07.2016)
- Villard L. 2007. MECP2 mutations in males. J Med Genet. 44(7):417-23
- Visser LE, de Vries BB, Veltman JA. 2010. Genomic microarrays in mental retardation: from copy number variation to gene, from research to diagnosis. J Med Genet. 47(5):289-97
- Weise A, Mrasek K, Klein E, Mulatinho M, Llerena JC Jr, Hardekopf D, Pekova S, Bhatt S, Kosyakova N, Liehr T (2012) Microdeletion and microduplication syndromes. J Histochem Cytochem 60(5):346–358
- Xu J. 2015. Next Generation Sequencing: Current Technologies and Applications. ChemMedChem. 10 (2):419–420

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Übersicht Metaphasen-CGH (Mohrmann 2013)	4
Abbildung 2:	Schematische Übersicht der Metaphasen- und Array-CGH (Fuhrmann 2007)	5
Abbildung 3:	Prozentuale Ursachen mentaler Retardierung (modifiziert nach Rauch 2008)	8
Abbildung 4:	Vergleich der Klassifikation individueller Patienten-Arrays 2010 und 2012 (modifiziert nach Palmer et al 2014)	13
Abbildung 5:	Überblick einiger Mikrodeletionssyndrome (modifiziert nach Vissers et al 2010 und Rost 2000)	16
Abbildung 6:	Grafik über die Zunahme der Publikationen zum Thema Mikrodeletionen und Mikroduplikationen während des Zeitraumes 1990 bis 2011 (Weise et al 2012)	17
Abbildung 7:	betroffenes genomisches Intervall und darin befindliche Gene bezüglich NCBI Build 36.1 vom März 2006 (hg18), UCSC Genome Browser	20
Abbildung 8 a und b:	Frontalfoto und Darstellung der Fingerpads	22
Abbildung 9:	betroffenes genomisches Intervall und darin befindliche Gene bezüglich NCBI Build 36.1 vom März 2006 (hg18), UCSC Genome Browser	23
Abbildung 10 a und b:	Frontalfoto sowie Darstellung windend-wringender Drehbewegungen der Hände („hand-washing-movements“)	24
Abbildung 11:	betroffenes genomisches Intervall und darin befindliche Gene bezüglich NCBI Build 36.1 vom März 2006 (hg18), UCSC Genome Browser	25
Abbildung 12:	Ergebnisse der Array-CGH	29
Abbildung 13:	Grafik der Häufigkeit craniofaziale Auffälligkeiten	30
Abbildung 14:	Grafik der Häufigkeit Fingerpads/Dermatoglyphen	30
Abbildung 15:	Grafik der Häufigkeit neurologisch-orthopädischer Auffälligkeiten insgesamt	31
Abbildung 16:	Grafik der Häufigkeit neurologisch-orthopädischer Auffälligkeiten aufgeschlüsselt	31
Abbildung 17:	Häufigkeit der Deletionen und Duplikationen auf den einzelnen Chromosomen	32
Abbildung 18:	Interpretation der Array-CGH Befunde 2010	32
Abbildung 19:	Interpretation der Array-CGH Befunde 2014	33

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflösungsvermögen ausgewählter zytogenetischer Darstellungsmethoden	4
Tabelle 2: Klassifikation der Intelligenzminderung	9
Tabelle 3: Detektionsrate verschiedener Methoden für die Ursachen mentaler Retardierung	11
Tabelle 4: Spezifität und Sensitivität craniofaziale Dysmorphien Kreuztabelle	34
Tabelle 5: Chi-Quadrat-Test/exakter Test nach Fisher CFD	34
Tabelle 6: Positiv und Negativ Prädiktive Werte CFD	34
Tabelle 7: Chi-Quadrat-Test/exakter Test nach Fisher Prädiktive Werte CFD	35
Tabelle 8: Spezifität und Sensitivität Fingerpads Kreuztabelle	35
Tabelle 9: Positiv und Negativ Prädiktive Werte Fingerpads	35
Tabelle 10: Chi-Quadrat-Test/exakter Test nach Fisher Fingerpads	36
Tabelle 11: Chi-Quadrat-Test/exakter Test nach Fisher Prädiktive Werte Fingerpads	36
Tabelle 12: Häufigkeitsverteilung der verschiedenen phänotypischen Merkmalsausprägung	37
Tabelle 13: Übersicht Deletionen/Duplikationen und Krankheitswert am eigenen Patientengut	38
Tabelle 14: Patientenübersicht	62
Tabelle 15 a und b: Spezifität, Sensitivität Kreuztabelle und Chi-Quadrat-Test/exakter Test nach Fisher neurologische + orthopädische Auffälligkeiten	75

11 Anhang

Datenerhebungsbogen

1) Angaben zur Person

- Name, Vorname, Geb.-Datum, Alter der Erstvorstellung, Alter des Patienten bei Diagnosestellung

2) Wachstum / Somatische Entwicklung

- Geburtsmaße: GG (g); GL (cm)
- KG (kg), KL(cm)- absolut
- Percentilenangaben für KL und Gewicht
- Hochwuchs
- Kleinwuchs
- Percentilenflüchtiges Wachstum

3) Klinische Symptomatik

- Entwicklungsverzögerung; Entwicklungsstörung
- Psychomotorische/Mentale Retardierung
 - Verzögertes Erreichen von Meilensteinen der Entwicklung (Sitzen, Stehen, Laufen)
 - Sprachentwicklungsstörung (fehlende Sprachentwicklung: kein aktives Sprechen und kein Verstehen, fehlende aktive Sprache bei vorhandenem Sprachverständnis, Agrammatische Sprache, Artikulationsstörungen)
 - Mikrocephalus / Makrocephalus (Kopfumfang in Percentilen)

4) Craniofaciale Dysmorphien

- Hypotelorismus/Hypertelorismus
- Metope Stirn/ asymmetrischer Schädel/ Schädeldeformitäten/
- Breite Nasenwurzel, Epikanthus
- Nase mit nach oben stehenden Narinen, flaches Philtrum, etc.
- Ohrenauffälligkeiten
 - Tiefsitzende Ohren
 - Dysplastische Ohren (Helixanomalien, Ohrläppchenanomalien, Mikrotie, Ohrenanhängsel)
 - Schwerhörigkeit (Schallleitungs-, Innenohr-Schwerhörigkeit)

5) Pathologische Dermatoglyphen/ Fingerpads

- Vierfingerfurche
- Anderweitig „Auffällige Handlinien“
- Persistierende Fingerpads

6) Haut- und Haarauffälligkeiten

- Hypo/Depigmentierung
- Hyperpigmentierung, Cafe au lait-Flecke
- Hellblonde Haare; hellblaue Augen

7) Neurologische/orthopädische Auffälligkeiten

- Muskeltonusstörungen (Hypertonus/Spastik, Hypotonus, Dystonie)
- Bewegungsstörungen (Ataxie, Tremor)
- Gangstörungen/Gangunsicherheit
- Krampfanfälle/Epilepsie
- KiSS (Typ 1; Typ2)
- Anomalien des Skeletts (WS, Thorax, obere Extremität, untere Extremität)
- Bindegewebsschwäche (überstreckbare Gelenke, Knick-Senk-Füße)

8) Verhaltensauffälligkeiten

- Hyperkinetisches Verhalten
- ADS/ADHS (mit / ohne Methylphenidat-Behandlung, Strattera-Therapie, andere Medikamente)
- Aggressives/autoaggressives Verhalten
- Selbstverletzungen
- Herabgesetzte soziale Integration
- Autismus/autistische Verhaltensweisen
- Distanzlosigkeit
- Lachanfalle

9) Wahrnehmungsstörungen

- Orofaciale Überempfindlichkeit
- Vermindertes Schmerzempfinden
- Sehstörungen (gestörtes Farbsehen, ...)

10) Teilleistungsstörungen

- LSR (Legasthenie) / Rechenschwäche (Dyskalkulie)

11) Zusätzliche für den Patienten charakteristische Merkmale

- Erhöhte Infektanfälligkeit
- Freitext

12) Genetische Untersuchungsbefunde

- Indikation zur genetischen Untersuchung
- Voruntersuchungen: Chromosomenanalyse / Ergebnis, FISH /Ergebnis
 - Ergebnisse der Array-CGH-Untersuchungen
 - Lokalisation (Chromosomen-Locus)
 - Art der Veränderungen: Deletion/ Duplikation
 - Ausdehnung (Mb)
 - Einbezogene Gene
 - Bekannte Genotyp-Phenotyp-Korrelationen
 - Vergleich mit Patienten-Datenbanken (DECIPHER,...)
 - Relevante Publikationen
 - Erbmodus („de novo“, von Eltern geerbt: ms,vs)
 - Beurteilung der Array CGH-Ergebnisse
 - „sicher pathologisch“ (es finden sich in der Literatur und den Datenbanken z.B. DECIPHER) vergleichbare Patienten mit überlappenden Bruchpunkten und ähnlicher klinischer Symptomatik, es ergeben sich Hinweise für direkte Genotyp-Phänotyp-Korrelationen
 - „fraglich pathologisch“ (es finden sich in der Region der Deletion/Duplikation von Genen, bei denen bekannt ist, dass sie

für bestimmte Erkrankungen verantwortlich sind oder an der ZNS-Entwicklung beteiligt sind oder funktionelle Schlüsselfunktionen aufweisen; der Verdacht auf Pathogenität wird erhärtet, wenn die Veränderungen beim Patienten „de novo“ entstanden sind

- „nicht sicher pathologisch“ (Nachweis von copy number-Veränderungen ohne sicheren Krankheitswert, d.h. in der Literatur oder der DECIPHER Datenbank finden sich keine vergleichbaren Patienten mit überlappenden Bruchpunkten und ähnlicher klinischer Symptomatik)
- normale CNV (copy number variants) – als Normvarianten geltend ohne pathologische Bedeutung
- kein Nachweis genomischer Veränderungen mit der verwendeten Methode (unter Beachtung der Auflösung des verwendeten CGH Arrays), d.h. es wurden keine Deletionen oder Duplikationen nachgewiesen

Tabelle 14: Patientenübersicht

Fall	Alter (bei Diagnosestellung)	Entwicklungsverzögerung / klinische Auffälligkeiten	craniofaz. Dysmorphien	neurologische Auffälligkeiten	Verhaltensauffälligkeiten/ Teilleistungsstörungen	orthopäd. Auffälligkeiten	Bildgebung (MRT, EEG)	genetische Untersuchungsbefunde
1	3 Jahre	globale Entwicklungsverzögerung, Sprachentwicklungsverzögerung, intellektuelle Befähigung nach Kramer-Test im Grenzbereich unter dem Durchschnitt zu weit unter dem Durchschnitt mit -17 Monaten Entwicklungsrückstand	hohe Stirn, große helle Augen	- hüpfen auf einem Bein nicht möglich - Einbeinstand sehr wackelig	"Tagträumen", Geschlechtszugehörigkeit kann nicht sicher angegeben werden		EEG: pathologisch, unspezifische kortikale Funktionsstörung, anfallsverdächtige Potenziale MRT: -drei unspezifische Demyelinisierungen rechts keine Heterotopien, kein Anhalt für Raumforderung	pathogene heterozygote Deletion auf Chromosom 15q13, Mutter trägt Deletion ebenso (leicht betroffen, Intelligenzdefizit), Vater trägt die Mutation nicht
2	3 Jahre	deutliche psychomotorische Retardierung mit Betonung der Sprachentwicklung, im Alter von 2 Jahren noch kein freies Sitzen, kein Stehen, eingeschränkte Kommunikation, ausbleibende Sprachentwicklung	diskrete dysmorphe Veränderungen an: - Stirn - Nase - Ohren	- muskuläre Hypotonie (generalisierte Muskelhypotonie) - fasziale Hypotonie	fraglich autistische Verhaltenszüge, kein Schmerzgedächtnis, vermehrte Infektanfälligkeit	Gangstörung (Innenrotation des linken Fußes)	EEG: lokale Funktionsstörungen rechts parieto-zentral MRT: schwere Hinreifungsstörung (fehlende Demyelinisierung mit Volumenreduktion der kortikalen Strukturen) insgesamt als deutliche Entwicklungsstörung des ZNS einzustufen	dup Xq28: pathogen, Mutter ebenfalls Trägerin der Duplikation, aber auf dem inaktivierten X à normaler klinischer Status
3	5 Jahre	psychomotorische Retardierung	diskrete dysmorphe Veränderungen an: - Stirn - Nase - Ohren	Koordinationsstörung	ADHS, reduziertes Schmerzempfinden			heterozygote Duplikation auf Chromosom 17, dup17p13.3: wahrscheinlich pathogen Eltern tragen die Duplikation nicht

4	4 Jahre	psychomotorische Retardierung	Hypertelorismus, breite Nasenwurzel, „fleischige Ohren“					Deletion auf Chromosom 10, del 10q26.13q26.13: benigne und eine pathogene Deletion auf Chromosom 16p11.2
5	15 Jahre	psychomotorische Retardierung	diskrete dysmorphe Veränderungen an: - Stirn - Nase - Ohren	Epilepsie, Microcephalie		Minderwuchs	MRT: Deformierung der Schädelkalotte, Abflachung der dorsalen Region	heterozygote interstitielle Deletion von Chromosom 1q43-q44: pathogen, insgesamt 12 deletierte Gene
7	6 Jahre	psychomotorische Retardierung	tief sitzende, große Ohren	Absence-Epilepsie			EEG: unspezifische Funktionsstörung, kein Herdbefund, kein Nachweis epilepsietypischer Potenziale	heterozygote Deletion auf Chromosom 2q13q13: pathogen
8	2 Jahre	psychomotorische Retardierung	Strabismus					heterozygote Duplikation auf dem Chromosom Nr. 17 im Gen-Locus 17p13.1. dup (17)(p13.1) mittels qPCR bei Mutter nachgewiesen - ebenfalls klinisch betroffen: Duplikation krankheitsverursachend

9	2 Jahre	psychomotorische Retardierung	tiefliegende Augen, leichte Ohrendysplasie, Vierfingerfurche, Sakralgrübchen			Skoliose, Beckenschiefstand, Innenrotation der Füße		heterozygote Deletion auf Chromosom 15 arr 15q25.1q25.2: pathogen
10	5 Jahre	komplexe Entwicklungsverzögerung, intellektuelle Befähigung nach Kramertest im weit unterdurchschnittlichen Bereich, durchschnittlicher Entwicklungsrückstand von -19 Monaten, Entw.-Tiefpunkte: Kognition, aktive Sprache, Sprachverständnis	diskrete dysmorphe Veränderungen an: - Stirn - Nase - Ohren	ungeschickte Feinmotorik	Enuresis	„steifer“ Gang	EEG: pathologisches EEG wegen einer fokalen Entladungstätigkeit in Form von sharp-waves links zentro-temporal MRT: altersentsprechendes unauffälliges Schädel MRT	- heterozygote Deletion auf Chromosom 15 arr 15q11.2: Pathogenität unklar
11	11 Monate	Wachstumsretardierung (< 3. Perz.) Vitium cordis, psychomotorische Entwicklungsverzögerung, ausgeprägte Fingerpads, erhöhte Infektanfälligkeit	dreieckiges Gesicht, Balkonstirn, große, tief liegende Augen, Skleren blau			überstreckbare Gelenke, Knickfüße bds.		in keinem der derzeit bekannten Loci für Microdeletions und - duplikationssyndrome + der Subtelomerregionen sowie in keiner anderen genomischen Region eine relevante Imbalance, nur benigne CNV- Imbalancen
12	4 Jahre	Wachstumsretardierung (< 3. Perz.), Mikrocephalus, Untergewicht	Ohrendysplasie, Augen wie bei Kabuki-Syndrom					heterozygote Duplikation auf Chromosom 14, dup 14q32.11: Pathogenität unklar und eine heterozygote Deletion auf Chromosom 16, del 16q23.3q24: Pathogenität unklar, wahrscheinlich nicht pathogen, Deletion auf Chromosom 16: rezessive Mutation bezüglich der primären Zilien-Dyskinesie

13	1 Jahr	Wachstumsretardierung (< 3. Perz.), Entwicklungsverzögerung, psychomotorische Retardierung, hypotrophes Neugeborenes bei Plazentainsuffizienz, pränatale auffällige Nackentransparenz), mit 17 Monaten Entwicklungsverzögerung von ca. 6 Monaten (freies Sitzen, Stehen mit Festhalten, noch kein freies Laufen), Hyperopie, Fingerpads, KISS-Syndrom, erhöhte Infektanfälligkeit	milde craniofaziale Dysmorphien	orofaziale Hypotonie				klinischer Verdacht auf Kabuki-Syndrom nicht bestätigt, keine Auffälligkeiten in der Array-CGH
14	9 Jahre	komplexe Entwicklungsverzögerung, Fingerpads				ausgeprägte Lendenlordose, leichter Beckenschiefstand, Knickfuß bds.		Array CGH: in keinem der derzeit bekannten Loci für Microdeletions und -duplikationssyndrome + der Subtelomerregionen sowie in keiner anderen genomischen Region eine relevante Imbalance, nur bekannte CNV-Imbalancen
15	8 Jahre	globale Entwicklungsverzögerung, auffällige Sprache mit Dyslalie und Dysgrammatismus	Schädeldysmorphie	allgemeine Haltungsschwäche bei Muskelhypotonie, Reflexe bds. nur sehr schwach auslösbar, Sensibilität im rechten Bein vermindert	intellektuelle Befähigung nach CFT1 weit unterdurchschnittlich	Knick-Senk-Spreizfüße	EEG: Befund altersentsprechend MRT: Kleinhirnhypoplasie links	4p16.1-p15.33: Pathogenität unklar, auch jeweils bei Vater und Bruder nachgewiesen werden konnten, NGS-Befund: Mutation im OPHN1-Gen des X-Chromosoms, Befund auch beim Bruder bestätigt
16	1 Jahr	Entwicklungsverzögerung, kleiner VSD, KISS-Syndrom	schmale Lidachsen, große Augen					in keinem der derzeit bekannten Loci für Microdeletions- und -duplikationssyndrome (<150 Konditionen) einschließlich der Subtelomerregionen sowie in keiner anderen genomischen Region eine relevante Imbalance

17	13 Jahre	Entwicklungsstörung der Grob- und Feinmotorik, Intelligenzminderung, Verlangsamung seit dem Vorschulalter, Fingerpads	milde CFD	Arme normoton, Beine hyperten: PSR und ASR seitengleich gesteigert, unsicherer Einbeinstand, Dysdiadochokinese, Ein- und beidbeiniges Hüpfen nicht altersgerecht, langsame und ungeschickte Fingerfeinmotorik	intellektuelle Befähigung nach CFT 20 im Grenzbereich von unterdurchschnittlich zu weit unterdurchschnittlich, weit unterdurchschnittliche Konzentrationsfähigkeit		EEG: Pathologisches Schlaf-EEG nach Schlaf-Entzug MRT: Normalbefund bis auf vergrößerte Hypophyse	heterozygote Deletion auf Chromosom 6q24.2: benigne
18	10 Jahre	psychomotorische Entwicklungsstörung	dysmorphe Veränderungen an: - Stirn - Nase - Ohren		fragliche autistische Verhaltenszüge, Probleme bei Farberkennung und Schreiben			heterozygote Deletion auf Chromosom 22, arr 22q11.23q11.23: benigne, klinisch nicht betroffene Mutter trägt Deletion ebenfalls
19	10 Jahre	Entwicklungsverzögerung Hashimoto- Thyreoiditis 2 Zöliakie Syndaktylie 3/4 beider Füße						trägt in keinem der derzeit bekannten Loci für Microdeletions- und -duplikationssyndrome (>150 Konditionen) einschließlich der Subtelomerregionen sowie in keiner anderen genomischen Region eine relevante Imbalance
20	6 Jahre	Triphalangie (dreigliedriger Daumen links), Nierengrößendifferenz, herabgesetzte physische Belastbarkeit	milde kraniofaziale Dysmorphien					- Aberration in der chromosomalen Region 5q12.2q12.3: benigne, klinisch nicht betroffene Mutter trägt Deletion ebenfalls
21	1 Jahr	kombinierte Entwicklungsstörung: statomotorische Retardierung, kann noch nicht stehen oder laufen, sitzt mit Unterstützung, ausgeprägte Fingerpads	geringe kraniofaziale Dysmorphien					heterozygote Duplikation auf Chromosom 16q22.1: benigne, Vater trägt Dup. ebenso (klinisch unauffällig)
22	13 Jahre	komplexe somatische und psychomotorische Entwicklungsstörung, Hochwuchs			Verhaltensstörung mit autoaggressivem Verhalten und Essstörung seit 2. Lj.		EEG: altersentsprechend	heterozygote Deletion auf Chromosom 1, arr 1q25.3: benigne

23	8 Jahre	kombinierte Entwicklungsverzögerung sekundäre Enuresis diurna et nocturna, Fingerpads			Sprachretardierung			- in keinem der derzeit bekannten Loci für Microdeletions- und -duplikationssyndrome (>150 Konditionen), einschließlich der Subtelomerregionen, sowie in keiner anderen genomischen Region mit der hier verwendeten Auflösung relevante Imbalance
24	14 Jahre	Entwicklungsverzögerung Sprachentwicklungsverzögerung		Frontallappenepilepsie, Gangunsicherheit				heterozygote Deletion auf Chromosom 6 6q22.1: benigne
25	9 Jahre	ehemaliges hypotrophes Frühgeborenes der 36. + 6 SSW, Zustand bei Kryptorchismus bds. mit Hernia inguinalis rechts, Aortenstenose I. Grades bei bikuspidaler Aortenklappe und offenem Foramen ovale, latente Hypothyreose, tiefgreifende psychomotorische Entwicklungsstörung, Minderwuchs + Mikrocephalie	Ptosis beidseits	erhebliche Störungen der Grob- und Feinmotorik	mentales Entwicklungsalter ca. 4 Jahre, Patient bedarf ständiger Aufsicht, da er keine Gefahren erkennt und sich ohne Eingreifen selbst und fremd gefährdend verhält, keinerlei aktive Sprache, bei relativ gutem Sprachverständnis			heterozygote Duplikation auf Chromosom 6, arr 6p22.3p25.3: pathogen
26	5 Jahre	verzögerte psychomotorische Entwicklung (Sitzen mit 9 Monaten, Laufen mit 1,5 Jahren, Sprechen mit 1,5 - 2 Jahren)	geringe craniofaziale Dysmorphien, großer Hirnschädel mit prominenter Stirn	Muskelhypotonie, Epilepsie	undeutliche Sprache, teilweise Verständnisprobleme und verlangsamtes Reagieren		EEG: pathologisch, für das Alter und die Vigilanz etwas zu langsame Grundaktivität MRT: deutliche Erweiterung der äußeren Liquorräume mit frontoparietotemporaler Betonung, als kortikale Hirnsubstanzminderung zu werten,	heterozygote Duplikation auf Chromosom 3 dup(3)(q33q24): Pathogenität unklar, heterozygote Deletion auf Chromosom 16 del(16)(p12.3p13.11): Pathogenität unklar

27	1 Jahr	psychomotorische Retardierung, aber deutliche Fortschritte: sitzt frei, steht auf, beginnt zu laufen, spricht Einzelworte, Fingerpads	geringer relativer Makrozephalus, Epikanthus bds					in keinem der derzeit bekannten Loci für Microdeletions- und -duplikationssyndrome (>150 Konditionen), einschließlich der Subtelomerregionen, sowie in keiner anderen genomischen Region mit der hier verwendeten Auflösung relevante Imbalance
28	13 Jahre	psychomotorische Retardierung multiple Cafe-au-lai-Flecke, trockene Haut an den Armen mit Juckreiz		PSR nicht auslösbar, Sensibilität Unterschenkel / Fuß herabgesetzt		Hohlfußdeformität		heterozygote Duplikation auf Chromosom 16 16q23.1: Pathogenität unklar, heterozygote Duplikation auf Chromosom 17 17p12: pathogen
29	4 Jahre	psychomotorische Entwicklungsverzögerung von ca. einem Jahr, Sprachentwicklungsverzögerung	ausgeprägte Dysmorphiezeichen				EEG: altersentsprechend MRT: altersentsprechend	Deletion oder Duplikation im Genom der oben aufgeführten Patientin kann mit der hier verwendeten Auflösung als krankheitsverursachender Mutationstyp ausgeschlossen werden
30	18 Monate	kombinierte Entwicklungsverzögerung, bei chronologischem Alter von 18 Monaten, durchschnittliches Entwicklungsalter 12 Monate, Sprachstörung und Dysphagie	auffällige Venenzeichnung im Stirnbereich okzipital abgeflacht, kurzer Hals, gespaltene Uvula, prominente Stirn und Nasenwurzel, Makrozephalus, Strabismus convergens bds	Muskelhypotonie			EEG: altersentsprechend MRT: keine supratentorielle Hirnsubstanzminderung, jedoch Volumenminderung von Hirnstamm und Cerebellum nachweisbar	Deletion oder Duplikation im Genom der oben aufgeführten Patientin kann mit der hier verwendeten Auflösung als krankheitsverursachender Mutationstyp ausgeschlossen werden
31	5 Monate	Mikrozephalus, Fallotsche Tetralogie- kardiopulmonal kompensiert	Strabismus, leicht livides Mund- Nase-Dreieck					1p36 Deletionssyndrom: pathogen, an der unteren Auflösungsgrenze liegende heterozygote Duplikation auf Chromosom 18 (18q23): benigne

32	10 Jahre	Aufmerksamkeitsstörung, Verdacht auf lese- Rechtschreibschwäche, Legasthenie (verwechselt Buchstaben), Impulskontrollstörung, schon immer "anstrengendes" Kind - schief wenig als Säugling, impulsives Verhalten mit Herumschreien, Thorax asymmetrisch mit Aplasie des M. pectoralis major (Poland-Syn.), geringe Größendifferenz zwischen Händen und Füßen beider Körperseiten, Schmerzempfinden herabgesetzt	CFD der Stirn, Augen und Nase, Fingerpads		impulsiv bis aggressiv, selbstunsicher, Kurzzeitkonzentration dezent auffällig, kein ADHS, event. einfache Aufmerksamkeitsstörung	allgemeine Haltungsschwäche mit Knick-Senkfüßen und Schulterschiefstand rechts	EEG: altersentsprechend zu langsame Grundaktivität	heterozygote Deletion auf Chromosom 2 2q33.2: benigne
33	3 Jahre	globale schwerste Entwicklungsverzögerung, schwere Gedeihstörung, Rektusdiastase, ASD 2. Grades (keine hämodynamische Relevanz)	CFD der Stirn, Augen und Nase, Fingerpads	Muskelhypotonie		Skoliose Kopfschiefgedeformität zugunsten links, Innenrotation des rechten Fußes, Klumpfuß rechts, Instabilität der Gelenke	MRT: Balkenhypoplasie	vierfache Gendosis: (log2- ration durchgehend +1) für den Bereich pter p11.21 (gesamter p-Arm) auf Chromosom 18 (bekannte Variante, pathogen, V.a. Isochromosom 18.p)
34	4 Jahre	West-Syndrom, fokale Epilepsie, verzögertes Erreichen der physiologischen Entwicklung, Astigmatismus, erhöhte Infektanfälligkeit			frühkindlicher Autismus, Aufmerksamkeits- und Konzentrationsstörungen		EEG: mäßig schwer allgemein verändertes EEG MRT: ohne patholog. Befund	keine genomischen Imbalancen -abgesehen von normalen Kopienzahlvariationen (CNV)
35	7 Jahre	Entwicklungsretardierung: zunächst normale Entwicklung, ab 3.-4. LJ langsame Entwicklung, Intelligenzminderung, Fingerpads	kantiges Gesicht, Hyperopie bds., große abstehende Ohren			Haltungsschwäche, Sitzbuckel		del arr 9q33.2q33.3: benigne

36	9 Jahre	psychomotorische Entwicklungsverzögerung, ausgeprägte Syndaktylien der 2. und 3. Zehen beider Füße und vermehrter Wachstumspotenz	CFD der Stirn, Augen, Ohren und Nase	neonatale Hypotonie, Störungen der Grob- und Feinmotorik, sowie der Koordination, eingeschränkte physische Belastbarkeit	Intelligenzminderung mit sonstiger Verhaltensstörung, Störung der Aufmerksamkeit und Impulskontrolle, manchmal aggressiv	Beckenschiefstand, große Füße, Hochwuchs	EEG: artefaktreiches EEG mit einer im pathophysiologischen Grenzbereich liegenden Grundaktivität	in keinem der derzeit bekannten Loci für Microdeletions- und -duplikationssyndrome (>150 Konditionen), einschließlich der Subtelomerregionen, sowie in keiner anderen genomischen Region mit der hier verwendeten Auflösung (>34,4 kb für Deletionen und > 68,7 kb für Amplifikationen) relevante Imbalance
37	19 Jahre	geistige Retardierung, Minderwuchs, Vierfingerfurche	tiefer Haaransatz, hohe Stirn, breite Frontzähne	Epilepsie	Intelligenzminderung mit geringer Verhaltensstörung			- in keinem der derzeit bekannten Loci für Microdeletions- und -duplikationssyndrome (>150 Konditionen), einschließlich der Subtelomerregionen, sowie in keiner anderen genomischen Region mit der hier verwendeten Auflösung (>34,4 kb für Deletionen und > 68,7 kb für Amplifikationen) relevante Imbalance
38	3 Jahre	Sprachentwicklungsretardierung durchschnittlicher Entwicklungsrückstand von 5 Monaten	milde CFD, Fingerpads	ataktische Gangstörung	aggressive Verhaltensstörung		EEG: altersentsprechend, MRT: externer erweiterter Liquorraum frontal	- in keinem der derzeit bekannten Loci für Microdeletions- und -duplikationssyndrome (>150 Konditionen), einschließlich der Subtelomerregionen, sowie in keiner anderen genomischen Region mit der hier verwendeten Auflösung (>34,4 kb für Deletionen und > 68,7 kb für Amplifikationen) relevante Imbalance

39	4 Jahre	Frühgeborenes der 33. SSW., komplexe Entwicklungsverzögerung, Entwicklungsalter 1 Jahr, PEG-und Tracheostoma-Versorgung	Mikrocephalie	Epilepsie		Klumpfüße	EEG: auffälliger Befund, nicht altersentsprechend	in keinem der derzeit bekannten Loci für Microdeletions- und -duplikationssyndrome (>150 Konditionen), einschließlich der Subtelomerregionen, sowie in keiner anderen genomischen Region mit der hier verwendeten Auflösung (>34,4 kb für Deletionen und > 68,7 kb für Amplifikationen) relevante Imbalance
40	7 Jahre	kombinierte Entwicklungsverzögerung Fingerpads	Hypertelorismus, leicht dysplastische Ohren, auffällige Augenbrauen		aggressives Verhalten, Angststörung			- in keinem der derzeit bekannten Loci für Microdeletions- und -duplikationssyndrome (>150 Konditionen), einschließlich der Subtelomerregionen, sowie in keiner anderen genomischen Region mit der hier verwendeten Auflösung (>34,4 kb für Deletionen und > 68,7 kb für Amplifikationen) relevante Imbalance
41	2 Jahre	Entwicklungsverzögerung	milde CFD					heterozygote Duplikation auf Chromosom 16 16p12.3p13.11: pathogen, heterozygote Deletion auf Chromosom 20 20p12.1: benigne
42	7 Jahre	Entwicklungsverzögerung, Daumenhypoplasie rechts mit nahezu regelrechter Beweglichkeit, nur Kraft gemindert	leicht tief liegende Augen re. < li.			Hohlfuß innen re. > li., beginnender Klumpfuß, Kyphoskoliose im BWS-Bereich		Dup Xp22.33: benigne

43	2 Jahre	Entwicklungsverzögerung, Adipositas, Strabismus konvergens	kraniofaziale Dysmorphien: - Makrocephalus - Schielen, Fingerpads		kein Sättigungsgefühl à Adipositas, V.a. PWS			- in keinem der derzeit bekannten Loci für Microdeletions- und - duplikationssyndrome (>150 Konditionen), einschließlich der Subtelomerregionen, sowie in keiner anderen genomischen Region mit der hier verwendeten Auflösung (>34,4 kb für Deletionen und > 68,7 kb für Amplifikationen) relevante Imbalance
44	2 Jahre	schwere Entwicklungsstörung mit Zeichen einer Regression, erhebliche Sprachretardierung	milde CFD	Tetraspastik			EEG: sehr unregelmäßig ablaufende Alpha-Aktivität um 8/s sowie Durchhalten von schlafbedingten Veränderungen der Stadien 1-4, pathologische Aktivität: Einstreuung von sharp-waves okzipital bds MRT: ausgedehnte Leukodystrophie nahezu des gesamten Marklagers und Erweiterung der Subarachnoidalräume	- in keinem der derzeit bekannten Loci für Microdeletions- und - duplikationssyndrome (>150 Konditionen), einschließlich der Subtelomerregionen, sowie in keiner anderen genomischen Region mit der hier verwendeten Auflösung (>34,4 kb für Deletionen und > 68,7 kb für Amplifikationen) relevante Imbalance
45	1 Jahr	psychomotorische Retardierung, sprachliche Verzögerung, Hochwuchs	orofaziale Schwäche, langes Gesicht					Deletion oder Duplikation im Genom des Patienten kann mit der verwendeten Auflösung als krankheitsverursachender Mutationstyp ausgeschlossen werden
46	12 Jahre	Entwicklungsstörung, Adipositas, Makrocephalus bei Hydrocephalus	breite Nase, wulstige Unterlippe, breiter Mund, Zahnfehlstellung					Deletion oder Duplikation im Genom des Patienten kann mit der verwendeten Auflösung als krankheitsverursachender Mutationstyp ausgeschlossen werden

47	2 Jahre	kombinierte Entwicklungsverzögerung mit Schwerpunkt auf Motorik, Fingerpads	Schädel relativ groß mit prominenter Stirn	unsicheres kleinschrittiges Gangbild, Ataxie, Beine hypoton, Arme normoton				- in keinem der derzeit bekannten Loci für Microdeletions- und -duplikationssyndrome (>150 Konditionen), einschließlich der Subtelomerregionen, sowie in keiner anderen genomischen Region mit der hier verwendeten Auflösung (>34,4 kb für Deletionen und > 68,7 kb für Amplifikationen) relevante Imbalance
48	8 Monate	Ernährungsprobleme, Trinkschwäche, Entwicklungsverzögerung	breite Nasenwurzel, fliehendes Kinn	hyperton, v.a. untere Extremität				- in keinem der derzeit bekannten Loci für Microdeletions- und -duplikationssyndrome (>150 Konditionen), einschließlich der Subtelomerregionen, sowie in keiner anderen genomischen Region mit der hier verwendeten Auflösung (>34,4 kb für Deletionen und > 68,7 kb für Amplifikationen) relevante Imbalance
49	5 Jahre	Entwicklungsverzögerung	milde CFD		ADS			in keinem der derzeit bekannten Loci für Microdeletions- und -duplikationssyndrome (>150 Konditionen), einschließlich der Subtelomerregionen, sowie in keiner anderen genomischen Region mit der hier verwendeten Auflösung (>34,4 kb für Deletionen und > 68,7 kb für Amplifikationen) relevante Imbalance

50	1 Jahr	Entwicklungsverzögerung	milde CFD	hypoton, v.a. die untere Extremität, sitzt unsicher				in keinem der derzeit bekannten Loci für Microdeletions- und -duplikationssyndrome (>150 Konditionen), einschließlich der Subtelomerregionen, sowie in keiner anderen genomischen Region mit der hier verwendeten Auflösung (>34,4 kb für Deletionen und > 68,7 kb für Amplifikationen) relevante Imbalance
----	--------	-------------------------	-----------	---	--	--	--	---

Tabelle 15 a und b: Spezifität, Sensitivität Kreuztabelle und Chi-Quadrat-Test/exakter Test nach Fisher neurologische + orthopädische Auffälligkeiten

2) Kreuztabelle

			neurologische + orthopädische Auffälligkeiten		Gesamt
			0	1	
Array-CGH positiv	0	Anzahl	8	15	23
		% innerhalb von Array-CGH positiv	34,8%	65,2%	100,0%
	1	Anzahl	9	18	27
		% innerhalb von Array-CGH positiv	33,3%	66,7%	100,0%
Gesamt		Anzahl	17	33	50
		% innerhalb von Array-CGH positiv	34,0%	66,0%	100,0%

Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (1-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	0,012 ^a	1	0,914	1,000	0,575
Kontinuitätskorrektur ^b	0,000	1	1,000		
Likelihood-Quotient	0,012	1	0,914		
Exakter Test nach Fisher					
Zusammenhang linear-mit-linear	0,011	1	0,915		
Anzahl der gültigen Fälle	050				

a. 0 Zellen (,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 7,82.

b. Wird nur für eine 2x2-Tabelle berechnet

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist, ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind, mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Herr Prof. Dr. Christian Hübner (Institut für Humangenetik Jena), Herr Prof. Dr. Seidel (SRH Waldklinikum Gera, Kinderarztpraxis Jena Winzerla), Herr Prof. Dr. Jürgen Kohlhasse (Praxis für Humangenetik Freiburg im Breisgau), Frau Dr. Kristin Mrasek (Institut für Humangenetik Jena), Herr Prof. Dr. Ingo Kurth (Institut für Humangenetik Aachen), Thomas Lehmann (IMSID Jena) sowie Dipl.-Ing. Jörg Schumann, die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 18.08.2016

Marika Frank

Danksagung

Ganz herzlich danken möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Christian Hübner für die Übernahme der Dissertation als Doktorvater und die damit verbundene herausragende fachliche Betreuung. Vielen Dank an Herrn Prof. Dr. med. Jörg Seidel für die Überlassung des Dissertationsthemas sowie sein großes Interesse und die Geduld, welche sehr wertvoll waren. Vielen Dank für die Bereitstellung der Patientenakten und Abbildungen.

Besonderer Dank gebührt auch Frau Dr. rer. nat. Kristin Mrasek, ihr großes Engagement in der Betreuung hat diese Arbeit erst möglich gemacht. Des Weiteren danke ich Herrn Prof. Dr. med. Ingo Kurth für seine unterstützenden Ratschläge und Verbesserungsvorschläge.

Herrn Prof. Dr. med. Jürgen Kohlhase aus Freiburg (Breisgau) danke ich für die Möglichkeit in seiner humangenetischen Praxis sowie Labor hospitiert haben zu dürfen. Ebenso geht mein Dank an das humangenetische Institut der Universität Jena, welches mir ebenso eine Hospitation in Ihrem Labor ermöglichte.

An alle Mitarbeiter der humangenetischen Praxis von Prof. Dr. med. Kohlhase, des humangenetischen Instituts der Universität Jena sowie an die Mitarbeiter der humangenetischen Sprechstunde von Prof. Dr. med. Seidel geht mein vielfältiger Dank.

Danken möchte ich zudem Herrn Thomas Lehmann vom statistischen Institut der Universität Jena für die überaus freundliche und fachlich kompetente Betreuung bei der statistischen Auswertung der Daten dieser Dissertation.

Mein abschließender Dank gebührt meinem Freund, Jörg Schumann, für seine Unterstützung im Bereich Informationstechnik sowie seine niemals endende moralische Unterstützung, die einen enormen Verdienst für das Gelingen dieser Arbeit ausgemacht hat.

Danke Mama, dass du mich immer ermutigt hast weiter zu machen und nie aufzugeben.